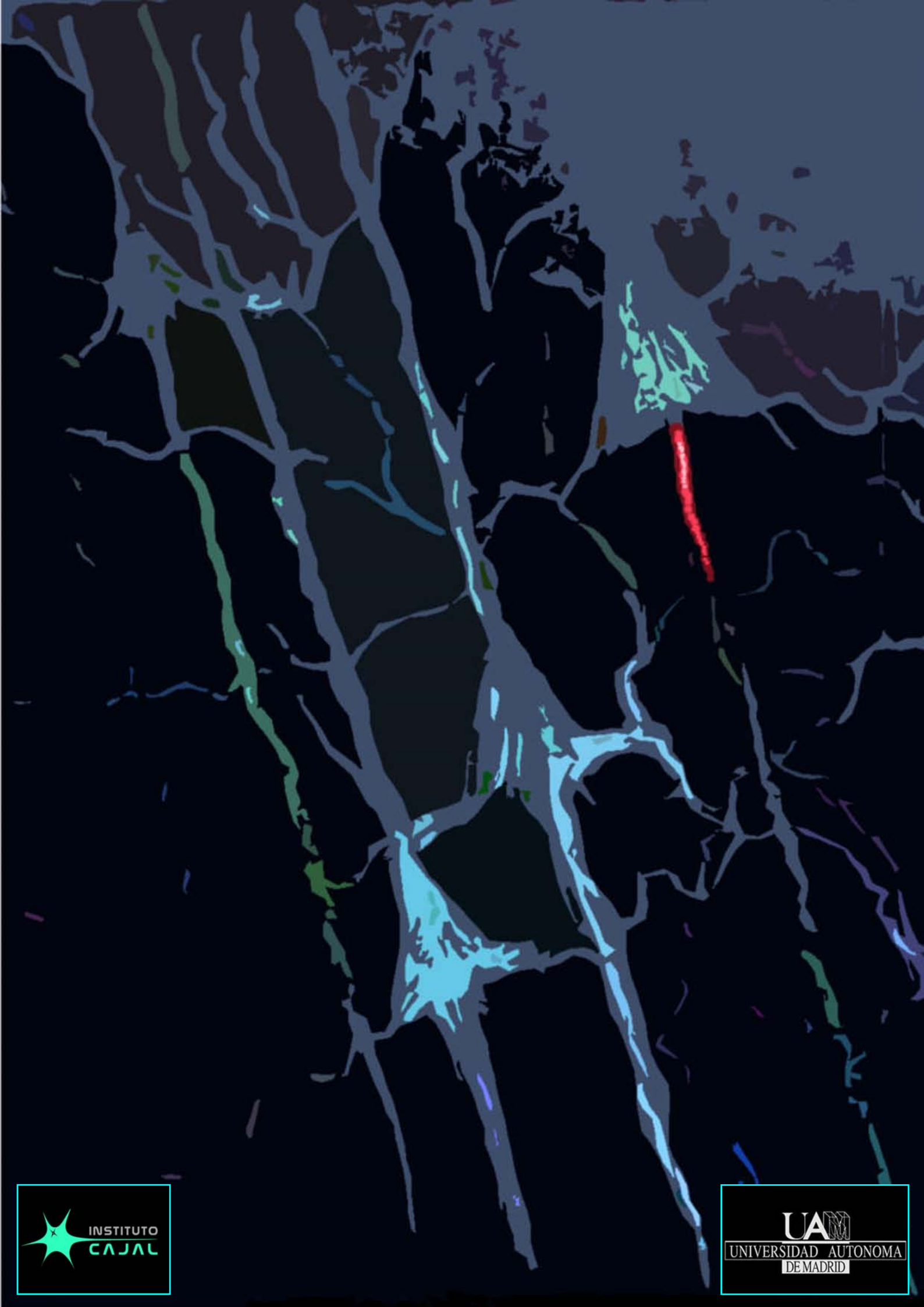


Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

FUNCIÓN DE HDAC6 Y β -CATENINA EN LA MADURACIÓN FUNCIONAL DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Mónica Tapia Pacheco
Madrid, 2012





Instituto Cajal
Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid



FUNCIÓN DE HDAC6 Y β -CATENINA EN LA MADURACIÓN FUNCIONAL DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Memoria de investigación presentada por

Mónica Tapia Pacheco

para obtener el título de
Doctor en Biología Molecular
de la Universidad Autónoma de Madrid

Trabajo dirigido por el Dr. Juan José Garrido Jurado

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Doctor Juan José Garrido Jurado en el Instituto Cajal (CSIC) y en el laboratorio del Doctor Francisco Wandosell en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Desde julio del 2007 hasta septiembre del 2008 ha sido financiado por un contrato de la red CIBERNED (ISCIII). Desde octubre del 2008 hasta la actualidad con una beca/contrato JAE del CSIC.

*A mi madre, mi hermana
y Alberto*

Agradecimientos

A lo largo de este difícil camino, desde el día que decidí estudiar biología hasta que pude iniciarme en el complejo mundo de la investigación, he tenido la suerte de contar con gente muy notable a mi alrededor. Este trabajo se ha convertido en una realidad gracias a todas las personas que aportaron su granito de arena, de una forma u otra, y que siempre formarán parte de mi vida, y por supuesto, llevaré en mi memoria.

En primer lugar, quiero dar las gracias a Juan José Garrido, mi director y mi mentor, durante todo ese proceso tan complejo que ha constituido la dedicación, de no pocos años, a un proyecto que se reconfiguraba a medida que trabajaba más en él. Al margen de enseñarme toda la metodología necesaria, formarme a nivel científico, y ser un recurso de discusión casi diaria, gracias concretamente por ayudarme a entender que, dedicarse a la ciencia, sólo merece la pena si repercute en tu enriquecimiento personal. Gracias por todo lo que me has enseñado, sin excepción y, por encima de todo, ayudarme a respetar, comprender y tolerar mejor la complejidad de las personas. ¡GRACIAS, BOSS!

A las tres mejores compañeras que se puede tener. Este camino nunca hubiera sido igual sin vosotras: Ana, Diana y Noemí. Me es imposible recordar todo lo que hemos vivido juntas, y todos los buenos momentos que me habéis aportado. Primero en el Cajal: el aprendizaje en un cubículo reducido; las pifias y las ideas brillantes; todos los momentos de... ¡tía, ha salido el experimento!!!; el primer congreso... y la primera mudanza. En el cbm: ¡luchemos por nuestras neuronas!!!, el primer ordenador y el primer juego de pipetas, ¡¡Vacas gordas!!, ¿me prestas unas placas?, emancipación, la caída de grandes mitos; nuestros manteles de colores, los congresos de Amsterdam y Tarragona... esos días serán inolvidables. Y por último, nuestra última etapa, segunda mudanza y ...¡vaya etapa! Pero, me quedo con las “calanques” y por supuesto, con nuestros inolvidables días en ¡¡NEW YORK!! Siempre tendréis un hueco especial en mi corazoncito...¡GRACIAS!

Gracias a los becarios de la Fundación Jiménez Díaz, que me enseñaron, por primera vez, lo que es trabajar en investigación. En especial a mis compañeros de reuma: Miriam, que siempre reservaba su mejor sonrisa; Mariángeles, que me enseñó con paciencia y dedicación todo lo que sabía; y a mi querido Juan, por enseñarme a relativizar, por esas tardes en el “Dalay” y por todas aquellas charlas más o menos triviales que me hicieron reír en tantas ocasiones. Gracias a la gente de nefrología por muchos y buenos momentos de café, comidas y ciencia.

A toda la gente que trabaja en el Instituto Cajal, en especial a María, por esa maravillosa ayuda técnica en el principio de los principios, ¡qué mal nos acostumbraste!. A los vecinos del C-17: Javi, Rubén y Andrés, por amenizar más de una tarde y más de una salida...la de Toledo, y las “atascaburras” fueron memorables. A Jorge y a Héctor por los congresos de Valencia y Tarragona, no habrían sido lo mismo sin vosotros.

A Paco Wandosell, por confiar en mí y darme la oportunidad de trabajar en investigación durante estos casi 6 años. Han sido muchos momentos de ciencia, discusiones, realidad, música e incluso algo más trascendental, en un día de festejo de tesis, como poner a prueba la auténtica y verdadera vocación de uno mismo. ¿Por qué no tener 2 vocaciones en vez de 1?

Como no, gracias a mis increíbles compañeros del 206, la época más prolífica de mi tesis, que me ayudaron a crecer tanto en la vida como en la ciencia. En primer lugar, a la gente que continuó su camino en otro laboratorio; a Lara R, por sus “frases míticas” y a Jonay por sus dosis de dulzura y actualidad diarias; a Olga por tantos momentos musicales a última hora de la tarde, con tiempo para alguno más trascendental. A Lara O, por su sarcasmo asturiano, y a Marta...por si algún día dejamos de fumar; a Marijose, por esas maravillosas conversaciones de buena mañana sobre cualquier cosa; a MariJose (biológicas) por su vitalidad y todos esos

buenos consejos científicos; a Ricardo, por sus eternas charlas sobre β -catenina y su inestimable ayuda con esas “líneas maravillosas”. A Maribel, por su reconfortante sonrisa diaria y por ayudarme a ver que la vida está hecha de pequeños placeres. A la mejor técnico que he conocido nunca, Nuria, que me demostró, día tras día, lo que es trabajar sin horario, aun sin perseguir un doctorado, y que todavía hay gente a la que le gusta el Rock!! A Jorge, por todos esos momentos decisivos, a nivel científico y a nivel de inspiración. Gracias por recordarme ese famoso e indispensable “plan B”, por esas charlas sobre cómo hay que estructurar una tesis doctoral, y cómo hay que enfrentar las publicaciones y, en definitiva, cómo tener mano izquierda. Siempre serás mi paradigma de post-doc, y sobre todo... gracias por esos momentos “Queen” a primera hora de la mañana. A Héctor, mi amigo y mi compañero para todo: ciencia, filosofía, juergas, confidencias... la mente más brillante y humana con la que he tenido el privilegio de trabajar ...creo que no hay otra persona como tú.

Por último, a toda la gente de otros laboratorios que ha estado siempre presente. A Jon, por ser el mejor ejemplo de optimismo, entusiasmo y sobre todo por su disposición a echar una mano siempre. Ana Franco, gracias por ser un ejemplo de coraje, inteligencia y locuacidad encomiables. A la gente de los laboratorios 208 y 207 por prestarme su ayuda, y sus reactivos en muchas ocasiones. Al servicio de microscopía óptica y confocal del CBM, el mejor servicio que he conocido. Y, en definitiva, a todas las personas del CBM que, en un momento u otro, se han interesado por cualquier aspecto profesional, musical o sentimental de mi vida.

A los electrofisiólogos, que me permitieron adentrarme en un mundo tan complejo, y tan excitante. Al laboratorio del doctor Alfonso Araque por su inestimable ayuda. Al laboratorio de Dominique Debanne, que me ayudó durante los 3 meses de mi estancia en Marsella, especialmente a Laure y Edmond, por su paciencia, por todo su tiempo, dedicación y profesionalidad. Y a la persona más importante en Marsella, Pierre...por todo; por enseñarme a “disparar”, por las charlas científico-político-vitalistas, por las maravillosas cenas en su paraíso marsellés, por los quesos franceses, por su amistad y por los momentos conciertísticos al aire libre, especialmente por el de Chick Corea.

A Jon y Kika, por hacerme más llevadera la estancia en Marsella y demostrarme que merece la pena vivir por la ciencia, fuera de tu país, aunque sea difícil.

He de dar las gracias a todas las personas que, lejos de un contexto científico, han estado ahí, para lo bueno, lo malo e incluso lo peor y, por encima de todo, que me han acompañado en todas mis aventuras y desventuras, antes y durante mi tesis doctoral.

A toda mi familia, en especial a Alberto Tapia, siempre seré el báculo de tu vejez, y a Laura Tapia, la sangre que mejor me entiende. A Carlos, Marga, Natalio, Heide, Loli y Ángel, que siempre me animaron a seguir con mi profesión, incluso en los momentos más difíciles. A mi profesor, Baudilio, que me animó y me ayudó en los momentos más trascendentales de mi época estudiantil. A todos mis compañeros y amigos de Leganés con los que aprendí a perseguir mis sueños, aunque fuera una estupidez estudiar biología. A los mejores vecinos del 111, sois únicos e irremplazables. A toda la gente de la “facul”, y en especial a las “chitas de la tosta”, la mejor época de mi vida.

A la gente que ha compartido mi otra gran vocación durante este camino, la música. A mi amigo Rafa “Coca”, por ser la persona que me empujó a soñar durante la etapa más trascendental de mi vida. Si no es por ti, por las noches con Peter Gabriel, y las risas interminables en el escenario, no sé qué hubiera sido de mí. A mis antiguos compañeros de Khy: a Daniel Fraile, por sus increíbles e imaginativas preguntas sobre neurociencia

y su maravilloso don para la idoneidad; a Juan Guadaño, por esos momentos inolvidables de funk y de verdadera magia al teclado después de insufribles tardes en el laboratorio; a Óscar y a Jaime, mis dos grandes compinches para todo...música, juerga, risas y...esas tardes en el “Serrat” después de los ensayos divagando sobre música y ciencia, de vez en cuando... ¡no sé cómo las soportábais!. Gracias a todos vosotros, por dar sentido a mi vida en cada ensayo, cada nota, cada compás, cada grabación hasta la madrugada...y sobre todo... por concederme el privilegio de disfrutar de lo más preciado que tengo...MI REFUGIO.

Por último, no podría haber realizado este trabajo sin determinadas personas que han sido, más tarde o más temprano, las verdaderas protagonistas de mi vida.

A Kenda y a Tamara, por estar siempre ahí. Tamara, gracias por todo: risas, comidas, trivialidades, viajes, chistes...por toda esa complicidad, y todas las charlas sobre la vocación y los sacrificios que exigen profesiones como las nuestras. Y, especialmente, por ayudarme a relativizar en momentos decisivos sobre mi futuro. A Kenda...¡qué puedo decir! gracias por tu forma de ser, agobios, estrés y angustias siempre se olvidan en tu compañía, y gracias por creer en mí, a la hora de desarrollar cualquiera de mis 2 facetas, la científica y la musical. A Víctor, mi mago particular de la maquetación, gracias mil. A Dani, gracias por ser tan genuino y por ayudarme a descubrir que sólo se es feliz si uno hace lo que realmente le gusta. Si vives la vida tal y como quieres puedes tener la suerte de que, quizás algún día, consigas ser tú mismo.

A mis tres mosqueteras, tan imprescindibles en mi vida. A Irene, la persona más feliz que conozco, y que tengo la suerte de tener a mi lado para que, ante cualquier circunstancia, la vida respire despreocupación y alegría. A Esther, el mayor torrente de vida que he conocido, y aunque ahora esté a 2 ó 3 países de diferencia, siempre me demuestra que hay que vivir, disfrutar, y sentir como si fuera el último día de tu vida. A Elisa, la mejor amiga que he tenido durante mi última etapa, ¡menos mal que vivías cerca! Podría darte las gracias por millones de momentos, pero sólo puedo decir, gracias por estar siempre ahí, para todo. Has sido mi tabla de salvación en la etapa más decisiva de este camino.

A mi madre que, sin lugar a dudas, es la mejor madre del mundo con todas sus perfecciones e imperfecciones, y me quedo con todas, sin excepción. Gracias por entregarme tu apoyo en todo lo que he hecho, comprender mis excentricidades, y regalarme todos tus mejores momentos. A mi hermana, Patricia, por luchar por mí en tantos momentos difíciles, y darme todo lo que tenía. Gracias a ti pude estudiar, trabajar en investigación, y seguir adelante con este sueño. Si tuviera que vivir de nuevo, no podría hacerlo sin la persona en la que más confío, la que mejor me conoce, y... ¡la mejor cantante del mundo!

Gracias a la persona que mejor ha completado mi existencia, a todos los niveles: que desveló mi esencia y comprendió mis sueños, que me obligó a que plantara cara a mis propios desafíos, que compartió mi entusiasmo, me ayudó a reforzar mis convicciones y poner los pies sobre la tierra sin perder el rumbo, que me ayuda a no perderme en los momentos de duelo, y ... que me quiere tal y como soy. Por todo, y todo lo que nos queda por vivir, gracias Alberto.

“Si tú llamas experiencias a tus dificultades y recuerdas que cada experiencia te ayuda a madurar, vas a crecer vigoroso y feliz, no importa cuán adversas parezcan las circunstancias” Henry Miller

Gracias, papá, por absolutamente todo lo que me diste... estés donde estés.

Índice

ABSTRACT	19
INTRODUCCIÓN	23
1 POLARIDAD NEURONAL	25
1.1 Las neuronas de hipocampo como modelo <i>in vitro</i> para el estudio de la polaridad neuronal	25
1.2 Polarización morfológica y funcional	26
2 EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN (SIA)	26
2.1 El segmento inicial del axón, lugar de generación del potencial de acción	26
2.2 Estructura y composición del segmento inicial del axón	27
2.3 Formación y anclaje del segmento inicial del axón	30
2.4 El segmento inicial del axón como barrera de difusión-segregación entre axón y dendritas	30
2.5 Patologías asociadas al segmento inicial del axón	31
3 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN LA POLARIDAD NEURONAL	31
3.1 Vías de señalización intracelular	31
3.2 Señales extracelulares que dirigen la polaridad neuronal	33
4 CITOESQUELETO NEURONAL	33
4.1 Citoesqueleto de actina y microtúbulos	33
4.2 Microtúbulos y morfogénesis neuronal	35
4.3 Regulación de la dinámica de microtúbulos	36
4.3.1. Proteínas que regulan la dinámica de microtúbulos	36
4.3.2. Quinasas implicadas en la regulación de microtúbulos	37
4.4 Modificaciones posttraduccionales de tubulina	38
4.4.1. Tirosinación/detirosinación/modificación $\Delta 2$	39
4.4.2. Poliglicilación y poliglutamilación	39
4.4.3. Acetilación	39
4.5 Motores moleculares, kinesinas	40
5 HISTONA DEACETILASA 6, HDAC6	40
5.1 Organización en dominios y características estructurales	41
5.2 Funciones de HDAC6	41
5.2.1. Funciones de HDAC6 dependientes de su actividad deacetilasa	42
5.2.2. Funciones de HDAC6 dependientes de su unión a ubiquitina	42
5.3 Regulación de HDAC6	43
6 β -CATENINA	43
6.1 Estructura y localización subcelular de β -catenina	44
6.2 β -catenina, proteína multifuncional	44
6.3 Regulación por fosforilación de β -catenina	46
OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	51
1 CULTIVOS CELULARES	51
1.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo y corteza	53
1.2 Cocultivo de neuronas de hipocampo con astrocitos	53
1.3 Neuroblastoma N2a (CCL-131-ATCC)	53
1.4 Cultivo organotípico de cerebro de ratón	54

2	TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS	55
3	PLÁSMIDOS	55
4	TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE N2A	55
5	ELECTROPORACIÓN (NUCLEOFECIÓN) DE NEURONAS DE HIPOCAMPO.....	55
6	INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE <i>GENE GUN</i>	55
7	EXTRACCIÓN CON DETERGENTES DE NEURONAS DE HIPOCAMPO	56
8	INMUNOCITOQUÍMICA.....	57
9	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	57
10	TINCIÓN GIEMSA.....	58
11	ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN (<i>WESTERN BLOT</i>).....	58
12	ELECTROFISIOLOGÍA.....	59

RESULTADOS 63

ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS MICROTÚBULOS Y HDAC6 DURANTE EL PROCESO DE POLARIDAD NEURONAL Y EL DESARROLLO DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN 65

1	COMPOSICIÓN DEL CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS EN EL AXÓN Y EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN	65
2	EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE HDAC6 DURANTE EL DESARROLLO NEURONAL <i>IN VITRO</i>	66
2.1	HDAC6 limita su expresión a los territorios de tubulina acetilada y colocaliza con tau-1 en el axón durante las primeras etapas de diferenciación <i>in vitro</i>	66
3	ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE HDAC6 EN AXONOGÉNESIS Y ELONGACIÓN AXONAL	67
3.1	Efectos de la expresión exógena de HDAC6.....	67
3.2	La inhibición y supresión de HDAC6 disminuyen la elongación axonal.....	68
3.3	La función de HDAC6 en la elongación axonal es dependiente de su actividad deacetilasa y no de su unión a proteínas ubiquitinadas	73
4	ESTUDIO DEL PAPEL DE HDAC6 EN LA FORMACIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN.....	74
4.1	La función de HDAC6 es necesaria para la concentración de proteínas en el segmento inicial del axón durante su formación.....	74
5	ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LOS MICROTÚBULOS EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN	76
5.1	La inhibición de tubulina deacetilasas altera la localización específica de los microtúbulos acetilados del SIA resistentes a extracción.....	76
5.2	La inhibición de tubulina deacetilasas reduce la concentración de ankirina G en el segmento inicial de neuronas maduras.....	77
5.3	La alteración farmacológica de la estabilidad de MT modifica las propiedades de unión de proteínas del SIA	78
6	INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE HDAC6 SOBRE EL TRASPORTE MEDIADO POR KINESINAS	79
6.1	La inhibición de HDAC6 altera la distribución polarizada de KIF5C.....	79
7	EFFECTO DE LA ACTIVIDAD DE GSK3 SOBRE LOS NIVELES DE ACETILACIÓN DE MICROTÚBULOS	81

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE β -CATENINA Y SU FOSFORILACIÓN POR GSK3 DURANTE EL DESARROLLO NEURONAL 83

1	LOCALIZACIÓN DE β -CATENINA Y β -CATENINA-PS33/37/T41 DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO NEURONAL.....	83
1.1	β -catenina se concentra en el axón en etapas iniciales de diferenciación <i>in vitro</i>	83
1.2	β -catenina-pS33/37/T41 se localiza de forma progresiva en el SIA <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	85

2 MECANISMOS DE LOCALIZACIÓN DE β-CATENINA-PS33/37/T41 EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN	89
2.1 β-catenina-pS33/37/T41 en el SIA no está asociada con APC y es independiente de la actividad del proteasoma	89
2.2 La localización en SIA de β-catenina-pS33/37/T41 es dependiente de la expresión de ankirina G.....	90
2.3 β-catenina-pS33/37/T41 comparte las mismas características de unión a SIA que otras proteínas del segmento inicial y depende de la integridad de los microtúbulos	91
2.4 La quinasa GSK3 se localiza en el segmento inicial del axón y es resistente a la extracción con detergentes.....	92
3 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE GSK3 Y LA SUPRESIÓN DE β-CATENINA EN PROCESOS DE EXCITABILIDAD NEURONAL.....	93
3.1 La inhibición de la fosforilación de β-catenina en S33/37/T41 reduce el agrupamiento de ankirina G y modifica las propiedades electrofisiológicas del SIA.....	93
3.2 La supresión de β-catenina reduce la concentración de proteínas del SIA y la excitabilidad neuronal	95
DISCUSIÓN	99
1 IMPORTANCIA DE LA ACETILACIÓN DE TUBULINA EN PROCESOS DE NEURODESARROLLO.....	101
2 HDAC6 COMO NUEVO REGULADOR DEL CRECIMIENTO AXONAL.....	102
2.1 La función de acetilasa de HDAC6 es necesaria para el crecimiento axonal.....	102
2.2 Regulación axonal de HDAC6	104
2.3 HDAC6 participa en la regulación del transporte mediado por kinesina-1.....	105
3 HDAC6, NUEVA PROTEÍNA IMPLICADA EN LA FORMACIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN.....	106
3.1 La importancia de las modificaciones posttraduccionales de tubulina en el segmento inicial del axón.....	106
3.2 El papel de HDAC6 en la formación del segmento inicial del axón	107
4 EL SIA DEPENDE DE LA INTEGRIDAD DE SU RED DE MT ASOCIADOS Y SUS PROPIEDADES VARÍAN EN FUNCIÓN DE SU FASE DE MADURACIÓN	108
5 β-CATENINA-PS33/37/T41, NUEVA FOSFOPROTEÍNA DEL SIA.....	109
5.1 β-catenina <i>versus</i> β-catenina-pS33/37/T41	109
5.2 Acumulación progresiva de β-catenina-pS33/37/T41 en el segmento inicial del axón	111
6 β-CATENINA-PS33/37/T41, NUEVA PROTEÍNA IMPLICADA EN EL PROCESO DE MADURACIÓN FUNCIONAL DEL SIA	112
7 NUEVAS IMPLICACIONES FUNCIONALES DE GSK3, HDAC6 y β-CATENINA EN EL SIA.....	115
CONCLUSIONES	117
BIBLIOGRAFÍA	121
ABREVIATURAS	137

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura I1.	Diferentes estadios del desarrollo de neuronas de hipocampo.....	25
Figura I2.	Potencial de acción	27
Figura I3.	Transmisión del potencial de acción	28
Figura I4.	Estructura y composición del SIA	29
Figura I5.	La quinasa GSK3 en la regulación de la polaridad neuronal	32
Figura I6.	Microtúbulos, inestabilidad dinámica.....	34
Figura I7.	Reorganización de MT durante la morfogénesis neuronal	35
Figura I8.	Proteínas reguladoras de MT en neuronas	37
Figura I9.	Modificaciones posttraduccionales de tubulina en neuronas	38
Figura I10.	Estructura en dominios de HDAC6.....	41
Figura I11.	Estructura de β -catenina.....	44
Figura I12.	Localizaciones subcelulares de β -catenina.....	45

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura M1.	Esquema del proceso de elaboración de un cocultivo primario de neuronas de hipocampo sobre astrocitos.....	54
Figura M2.	<i>Gene Gun</i>	56
Tabla M1.	Tratamientos farmacológicos	59
Tabla M2.	Plásmidos empleados	60
Tabla M3.	Anticuerpos empleados	60

RESULTADOS

Figura R1.	Los microtúbulos del SIA son resistentes a la extracción con detergentes y están detirosinados y acetilados	65
Figura R2.	Distribución de HDAC6 en neuronas de hipocampo.....	66
Figura R3.	Localización axonal de HDAC6 a lo largo del desarrollo <i>in vitro</i>	67
Figura R4.	Efectos de la expresión exógena de HDAC6	68
Figura R5.	La inhibición de HDACs afecta a la formación y a la elongación axonal.....	69
Figura R6.	La inhibición de HDAC6 afecta tanto a la formación como a la elongación axonal.....	70
Figura R7.	La supresión de HDAC6 con interferencia shRNA reduce la elongación axonal en neuronas de hipocampo.....	71
Figura R8.	Cuantificación de la expresión de HDAC6 en neuronas de hipocampo nucleofectadas con shRNA <i>scramble</i> y shRNA HDAC6	71
Figura R9.	La inhibición y supresión de HDAC6 aumenta los niveles de α -tubulina acetilada en neuronas de hipocampo.....	72
Figura R10.	La inhibición y supresión de HDAC6 altera la dinámica de microfilamentos de actina.....	72
Figura R11.	Los efectos de HDAC6 sobre elongación axonal son dependientes de su actividad deacetilasa	73
Figura R12.	El tratamiento con TSA altera la concentración de ankirina G y canales de sodio en el segmento inicial del axón.....	74
Figura R13.	El tratamiento con tubacina disminuye la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA	75
Figura R14.	La supresión de HDAC6 afecta a la localización de ankirina G y canales de sodio en el SIA.....	76
Figura R15.	La inhibición de tubulina deacetilasas altera el enriquecimiento específico de los MT acetilados del SIA resistentes a extracción.....	77
Figura R16.	La inhibición de deacetilasas altera los niveles de ankirina G en el segmento inicial	78

Figura R17. Fármacos que afectan a los procesos de inestabilidad dinámica de MT producen cambios en la distribución de proteínas del SIA en neuronas maduras	79
Figura R18. La inhibición de deacetilasas con TSA altera la distribución polarizada de KIF5C.....	80
Figura R19. La supresión de la actividad de HDAC6 altera la distribución polarizada de KIF5C.....	80
Figura R20. La inhibición de GSK3 aumenta los niveles de acetilación en neuronas	81
Figura R21. β -catenina-pS33/37/T41 se concentra en el axón nascente en estadios tempranos y está asociada a MT	83
Figura R22. Los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 son dependientes de la actividad de GSK3	84
Figura R23. β -catenina-pS33/37/T41 se concentra en el SIA a partir del tercer día de diferenciación <i>in vitro</i>	85
Figura R24. β -catenina-pS33/37/T41 se concentra en el SIA a partir del tercer día de diferenciación <i>in vitro</i> y disminuye su concentración en centrosoma en estadios avanzados de desarrollo	86
Figura R25. La supresión de β -catenina con ARN de interferencia reduce los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 y disminuye la longitud axonal	86
Figura R26. La supresión de β -catenina con ARN de interferencia reduce los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA	87
Figura R27. La supresión de β -catenina con ARN de interferencia reduce la longitud dendrítica	87
Figura R28. Concentración progresiva de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA <i>in vivo</i>	88
Figura R29. β -catenina fosforilada por GSK3 se asocia con APC en el axón pero no en el segmento inicial del axón	89
Figura R30. La inhibición del proteasoma no altera la expresión de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA pero sí aumenta su concentración en soma	90
Figura R31. La expresión de ankirina G es necesaria para la localización de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA.....	90
Figura R32. β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA es resistente a la extracción con detergentes	91
Figura R33. La localización en el SIA de β -catenina-pS33/37/T41 depende de la integridad de sus MT asociados	92
Figura R34. GSK3 $\alpha\beta$ es resistente a la extracción con detergentes en el SIA.....	93
Figura R35. La inhibición de GSK3 y la reducción de los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 disminuyen el anclaje de ankirina G en el SIA.....	94
Figura R36. La inhibición de GSK3 y la reducción de los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 modifican las características del potencial de acción	94
Figura R37. La supresión de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 con ARN de interferencia durante estadios maduros reduce el anclaje de ankirina G y canales de sodio en el segmento inicial	95
Tabla R1. Resumen de las distintas categorías de intensidad de fluorescencia (elevada, reducida o ausente) de proteínas del SIA después de la expresión crónica de interferentes de β -catenina.....	96
Figura R38. Introducción aleatoria de ADN en rodajas de cerebro en cultivo empleando la herramienta <i>Gene Gun</i>	97
Figura R39. La interferencia de β -catenina disminuye la expresión de β -catenina-pS33/37/T41 y ankirina G en el SIA, la corriente de canales de sodio dependiente de voltaje y el disparo de potenciales de acción en rodajas de cerebro.....	98

DISCUSIÓN

Figura D1. La actividad de HDAC6 regula el anclaje de ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje modulando los niveles de α -tubulina acetilada	108
Figura D2. Diferentes localizaciones de β -catenina-pS33/37/T41 a lo largo del desarrollo <i>in vitro</i> de neuronas de hipocampo.....	112

Abstract

ABSTRACT

The axon initial segment, a highly specialized domain, develops from the very beginning of axon formation and keeps segregated somatodendritic and axonal compartments. The AIS accomplishes three main functions: generation of action potential, membrane diffusion barrier and cytoplasmic traffic control. Different structural and functional proteins are highly concentrated at the axon initial segment and contribute to these functions. The interaction of this complex protein network with neuronal cytoskeleton is essential to maintain cohesion and architecture of this domain. Although several cytoskeletal and scaffold proteins have been described at this domain, little is known about the properties of the MT cytoskeleton associated with the axon initial segment and its regulation.

In this work, we first studied the characteristics of the AIS microtubules cytoskeleton and the role of HDAC6 and GSK3, both proteins involved in microtubule dynamics. Our data demonstrate for the first time that the AIS microtubules are acetylated, and the identity of this domain depends on their integrity. HDAC6, a deacetylase that controls the level of tubulin acetylation, is preferentially located in the distal axon, regulating the rate of axon growth and ensuring the optimal degree of acetylation and microtubules dynamics. In fact, HDAC6 inhibition or suppression impair AIS structural and functional proteins tethering in this domain. Furthermore, GSK3 kinase is located at the AIS, and its activity regulates the level of β -catenin phosphorylation at S33/37/T41. Our results show that β -catenin-pS33/37/T41 is tethered at the AIS in hippocampal and cortical neurons in the later stages of development. Its important role in axon initial segment maturation is reflected by the fact that pharmacological inhibition of GSK3, or β -catenin suppression, impair the tethering at the AIS of ankyrinG and sodium channels and thus diminish neuronal excitability.

In summary, our data show that the integrity of the MT cytoskeleton in the AIS is critical for concentration of essential proteins such as ankyrinG or voltage-gated sodium channels. This integrity depends on HDAC6 activity and also on GSK3, acting at least on β -catenin at the AIS, being both important enzymes in the correct AIS morphological and functional maturation.

RESUMEN

El segmento inicial del axón es un dominio especializado que se forma poco después del establecimiento de la polaridad neuronal. Diferentes proteínas estructurales y funcionales se concentran específicamente en el segmento inicial del axón y contribuyen a la generación del potencial de acción y, al mismo tiempo, constituyen una barrera de difusión que mantiene segregados los compartimientos somatodendrítico y axonal. La interacción de este complejo entramado de proteínas con el citoesqueleto neuronal es imprescindible para mantener la cohesión y arquitectura de este dominio. Si bien se han descrito muchas de las proteínas y canales que lo conforman, poco se sabe acerca de las propiedades del citoesqueleto de MT asociado al segmento inicial y de las proteínas implicadas en su regulación.

En este trabajo por primera vez estudiamos las características del citoesqueleto de microtúbulos asociado al SIA así como el papel de HDAC6 y GSK3, ambas proteínas implicadas en la regulación de la dinámica de microtúbulos. Nuestros datos demuestran por primera vez que los microtúbulos asociados al citoesqueleto del SIA están acetilados, y que la identidad de este dominio depende de la integridad de los mismos. HDAC6, proteína que regula los niveles de acetilación de MT, se localiza preferentemente en el axón distal donde modula la tasa de crecimiento del axón y garantiza el óptimo grado de acetilación de MT en el segmento inicial del axón. De hecho, la inhibición o supresión de HDAC6 altera el anclaje de proteínas en el SIA y los niveles de acetilación de MT asociados al citoesqueleto. Por otro lado, la quinasa GSK3 está localizada en el SIA y su actividad regula los niveles de β -catenina-pS33/37/T41, una proteína que hasta el momento se creía era degradada por la célula una vez fosforilada por GSK3. Nuestros resultados demuestran que β -catenina-pS33/37/T41 no sólo no es degradada por la célula, sino que se concentra específicamente en el SIA de neuronas de hipocampo y corteza durante las etapas posteriores a su formación. La inhibición farmacológica de GSK3 o la supresión de los niveles de β -catenina impiden el correcto anclaje de proteínas específicas en el segmento inicial del axón y repercuten en la excitabilidad neuronal.

En resumen nuestros datos revelan que la integridad del citoesqueleto de MT en el SIA es fundamental para la concentración de proteínas esenciales como ankirina G o canales de sodio voltaje dependientes. La actividad de HDAC6 y de GSK3, a través de su sustrato β -catenina, es esencial para la correcta maduración funcional de este dominio.

Introducción

1. POLARIDAD NEURONAL

La polaridad en las neuronas se manifiesta a distintos niveles: molecular, morfológico y funcional. Los axones son procesos largos y delgados, en contraste con el compartimento somatodendrítico donde las dendritas son más cortas, de apariencia cónica y muy ramificadas. A nivel molecular ambos dominios poseen una maquinaria adecuada a la recepción, en el caso de las dendritas o a la transmisión de información en axones, y poseen a su vez dominios especializados como las espinas dendríticas, el segmento inicial del axón o las terminaciones axonales (Kandel et al., 2000). En resumen, la polaridad morfológica y molecular de las neuronas refleja la diferente función desempeñada por axones y dendritas.

1.1 LAS NEURONAS DE HIPOCAMPO COMO MODELO *IN VITRO* PARA EL ESTUDIO DE LA POLARIDAD NEURONAL

Para el estudio de la polaridad neuronal el cultivo primario de neuronas disociadas a partir de hipocampo es uno de los sistemas modelo mejor caracterizados (Dotti et al., 1988; Kaech and Banker, 2006), que permite recapitular muchos aspectos del desarrollo neuronal *in vivo*, incluyendo polarización, maduración y sinaptogénesis.

Durante el proceso de polarización neuronal se establece una secuencia estereotipada de eventos que puede dividirse en 5 estadios diferenciados (Dotti et al., 1988). Poco después de adherirse al sustrato las neuronas empiezan a formar un lamelipodio, estructura dinámica rica en actina, en torno a su cuerpo celular (estadio 1). Posteriormente, la estructura del lamelipodio se condensa en 4-5 procesos cortos que dan lugar a neuritas inmaduras en el estadio 2. Estas neuritas presentan un comportamiento dinámico donde alternan procesos de extensión y retracción hasta que una de ellas, hacia el final del estadio 2, comienza a crecer rápidamente para convertirse en el axón (estadio 3, después de 1-1,5 días en cultivo). La especificación axonal o axonogénesis, es el evento crucial en el proceso de polarización neuronal donde un único axón crece rápidamente mientras el resto de neuritas adquieren identidad dendrítica. Poco después de esta especificación axonal en la región proximal del axón se inicia la formación del segmento inicial del axón, otra estructura fundamental en polaridad de la que se hablará más adelante. Después de aproximadamente 4 días en cultivo, las neuritas restantes comienzan a alargarse creciendo a un ritmo mucho más lento para formar las dendritas (estadio 4). Durante el estadio 5 (> 7 días de cultivo) las neuronas forman contactos sinápticos funcionales, aparecen las primeras espinas dendríticas y se generan corrientes eléctricas (fig. I1).

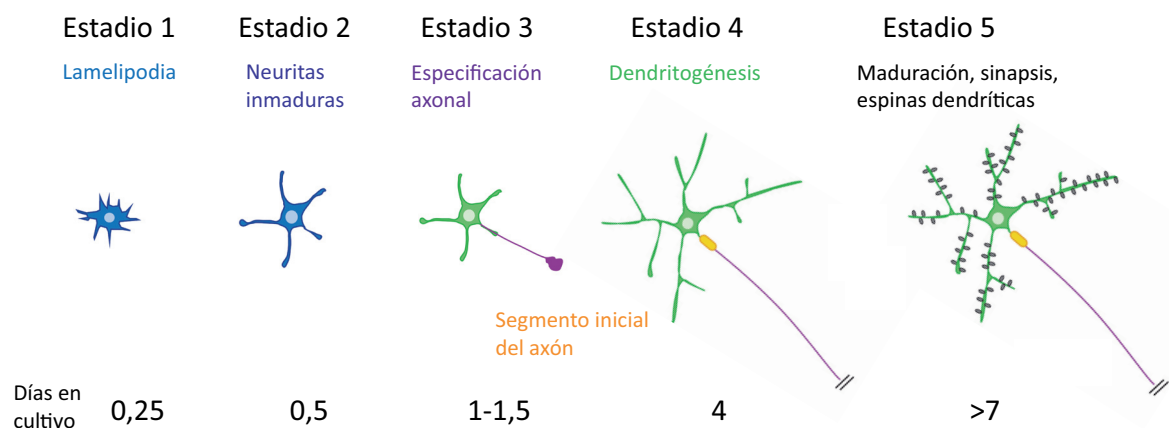


Figura I1. Diferentes estadios del desarrollo de neuronas de hipocampo. Imagen adaptada de Barnes and Polleux, 2009.

1.2 POLARIZACIÓN MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL

La ruptura de la simetría morfológica es el paso inicial en el proceso de polarización, cómo se especifica un único axón de entre varias neuritas igualmente potenciales. Para alcanzar esta asimetría una de las hipótesis más plausibles plantea la existencia de un sistema de señalización sujeta a retroalimentación positiva y negativa en los conos de crecimiento neurítico. Señales positivas y negativas se compensan durante el estadio 2 hasta que se rompe el equilibrio en el estadio 3 y se genera, por un lado, una señal de auto-activación del sistema (retroalimentación positiva) que impulsa el crecimiento del axón, a la vez que una fuerte señalización negativa hacia el cuerpo celular frena el crecimiento en el resto de neuritas (Andersen and Bi, 2000). Durante el estadio 2, es notable además un incremento en el flujo global hacia el axón nascente de organelas (mitocondrias, peroxisomas, ribosomas y vesículas derivadas del trans-golgi) y proteínas de membrana (GAP-43, Sinapsina I y Sinaptofisina, entre otras) (Bradke and Dotti, 1997). La extensión del axón es después impulsada por varios factores: un aumento en la cantidad de membrana plasmática, que resulta del reclutamiento y fusión de vesículas; un incremento en la concentración local y activación de moléculas de señalización y sus receptores; y un aumento en la dinámica de filamentos de actina y polimerización de microtúbulos.

La regulación espacial de proteínas mediante degradación selectiva ha sido descrita en diversos contextos durante la diferenciación neuronal (Yan et al., 2006; Schwamborn et al., 2007; Cheng et al., 2011). Otro factor determinante es el tráfico intracelular de cargos mediado por kinesinas que dirigen el transporte de organelas, proteínas de citoesqueleto y proteínas específicas de formación axonal (Nakata and Hirokawa, 2007).

Tras el establecimiento inicial de la polaridad neuronal, las neuronas tienen que mantener su polarización para integrar de forma estable los circuitos neuronales. La existencia de una barrera física en el **segmento inicial del axón** permite mantener la segregación molecular entre compartimentos somatodendrítico y axonal, tema que será desarrollado en profundidad en la siguiente sección.

2. EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

El segmento inicial del axón (SIA) es un dominio axonal clave en la generación del potencial de acción. Su compleja estructura comprende una densa agrupación de canales iónicos y proteínas, comunicados a través de proteínas *scaffold* o andamio con un citoesqueleto especializado. Constituye a su vez una barrera física en la región proximal del axón que regula el tráfico polarizado de moléculas, y mantiene segregados los compartimentos somatodendrítico y axonal. En esta sección desarrollaremos brevemente los aspectos más relevantes de su estructura, génesis y fisiología.

2.1 EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN, LUGAR DE GENERACIÓN DEL POTENCIAL DE ACCIÓN

La característica más importante de las neuronas es su capacidad de integrar y transmitir información mediante la generación de una señal de salida llamada potencial de acción, AP (*action potencial*). Un exceso de carga positiva en el exterior y carga negativa en el interior genera una diferencia de potencial en la membrana (V_m). Convencionalmente se establece el valor del potencial de membrana en reposo (V_r) en -60 mV (mili-voltios). Cuando llega un estímulo, o señal de entrada, se producen cambios secuenciales en la permeabilidad selectiva de la membrana a los iones Na^+ y K^+ (**fig. 12**). Por encima de un umbral de potencial de membrana específico (-40 mV), la apertura de los canales de sodio sensibles a voltaje provoca una entrada masiva de iones Na^+ y un flujo neto de carga positiva. Esto se traduce en una despolarización, ya que el

potencial de membrana se dirige hacia el potencial de equilibrio del sodio (alrededor de 50 mV). La apertura de canales sensibles a voltaje en tramos cercanos de membrana conlleva la propagación de la onda de despolarización a lo largo del axón. Durante esta despolarización se producen la inactivación de los canales de sodio y la activación de los canales de potasio. Un flujo de salida de K^+ produce una rápida hiperpolarización de la membrana, que alcanza de nuevo el valor del potencial de reposo. Por lo tanto, el potencial de acción se puede definir como una señal estereotipada de despolarización transitoria de todo o nada, que se extiende activamente a lo largo del axón sin atenuación (**fig. 12**) (Kandel et al., 2000).

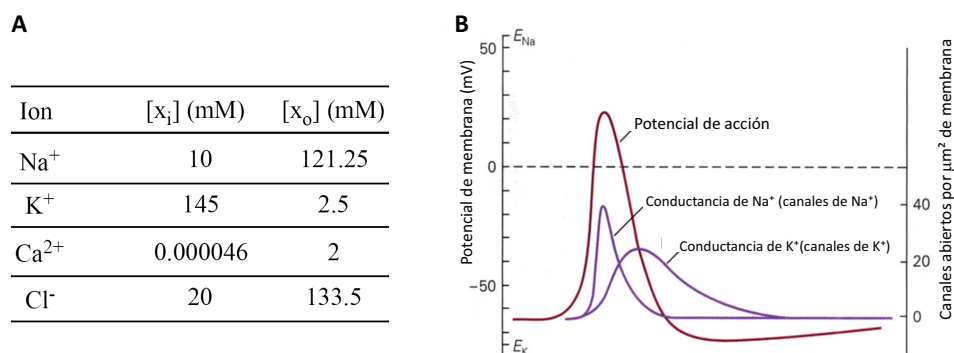


Figura 12. Potencial de acción. (A) Concentración de iones en el exterior (x_o) e interior (x_i) de la neurona. (B) La apertura secuencial de los canales de Na^+ y K^+ sensibles a voltaje generan el potencial de acción. Imagen adaptada de Kandel et al., 2000.

Dada su elevada densidad de canales de sodio, el segmento inicial del axón se ha propuesto como sitio de iniciación del PA. Adicionalmente, el SIA representa un compartimiento eléctrico muy pequeño, en comparación con el soma, y necesita una menor cantidad de carga en su membrana para alcanzar un mismo valor dado de V_m . Estas dos características estructurales permiten que en el SIA el umbral de corriente para la generación del PA sea menor (revisado en Clark et al., 2009; Debanne et al., 2011). Una vez generado en el SIA, la propagación del impulso en neuronas mielinizadas se produce en los **nodos de Ranvier**. Estas estructuras, de composición muy similar a los segmentos iniciales, poseen igualmente un alto contenido en canales de sodio por lo que, tras recibir la onda de despolarización, disparan de nuevo un tren de potenciales a lo largo de los internodos axonales. (**fig. 13**)

La actividad eléctrica de neuronas individuales se puede registrar mediante la técnica de *patch-clamp* o técnica de parche, donde el principio fundamental es la formación de un cierre hermético (*giga-seal*) entre una pipeta de vidrio y la membrana neuronal. Esta configuración permite la medición de corrientes y pequeños voltajes involucrados en la actividad neuronal. Se pueden emplear dos modalidades: fijación de voltaje o *voltage-clamp*, para detectar las distintas corrientes que atraviesan la membrana de la célula registrada y fijación de corriente o *current-clamp*, empleada para detectar los cambios de potencial de membrana. (Neher and Sakmann, 1976; Hamill et al., 1981).

2.2 ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

El SIA está constituido principalmente por canales iónicos, moléculas de adhesión y de la matriz extracelular y proteínas de anclaje, que sirven de unión directa o indirecta con el citoesqueleto de actina y MT (**fig. 14**).

En el SIA coexisten múltiples tipos de canales iónicos: de Na^+ , K^+ , y, recientemente identificados, canales de Ca^{2+} . Sin embargo, la principal característica del SIA es su elevada densidad de **canales de sodio dependiente de voltaje**, indispensables para el inicio del potencial de acción. Su agrupación en el segmento inicial abarca una extensión aproximada de 35-45 μm con una densidad de 40-50 veces la encontrada en soma o dendritas (Kole et al., 2008; Lorincz and Nusser, 2010). Se han identificado tres tipos diferentes de canales de sodio

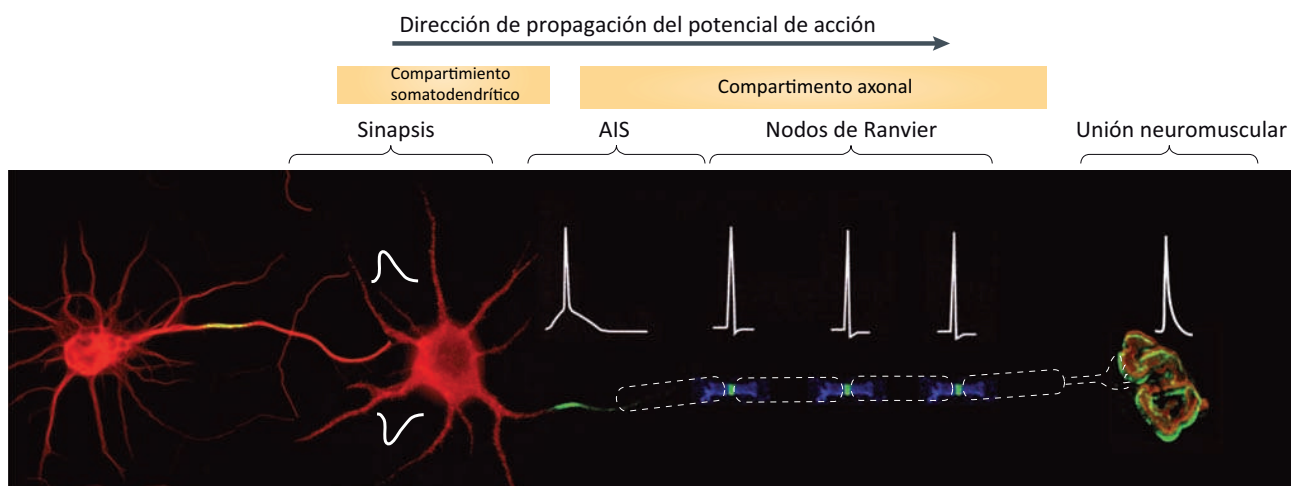


Figura 13. Transmisión del potencial de acción. Imagen adaptada de Rasband, 2010.

en el SIA: Nav1.1, Nav1.2 y Nav1.6, de expresión variable dependiendo del tipo neuronal y el estado de desarrollo, y con una localización específica dentro del SIA. De este modo, los canales Nav1.2 y Nav1.1 ocupan la región proximal, mientras que los Nav1.6 se concentran en las zonas distales del segmento inicial, contribuyendo de forma diferencial en la iniciación y propagación del potencial de acción (Van Wart et al., 2007; Hu et al., 2009).

Los **canales de potasio dependientes de voltaje** constituyen el segundo grupo mayoritario de canales en el SIA, como moduladores clave de la excitabilidad neuronal e iniciación del potencial de acción. Existe una gran variedad de tipos, incluyendo canales Kv1 (Kv1.1, 1.2 y 1.4,,), Kv2 (Kv2.1 y 2.2) y canales Kv7 o KCNQ2/3 (revisado en Clark et al., 2009). Los canales Kv1 modulan tanto la iniciación como la forma del potencial de acción, dado que se activan rápidamente a umbrales inferiores de potencial de acción (Kole et al., 2007; Goldberg et al., 2008), mientras que los Kv2 controlan la frecuencia de disparo ocupando zonas más proximales del SIA (Johnston et al., 2008). Los canales KCNQ contribuyen a estabilizar el potencial de reposo y limitar el disparo repetitivo ya que, a diferencia de los Kv1, se activan más lentamente generando las corrientes subumbral tipo M (Shah et al., 2008).

Por último, se ha descrito recientemente en varios tipos neuronales la presencia de **canales de calcio dependientes de voltaje** en el SIA, incluidos Cav2.1/2.2/2.3 y Cav3, (revisado en Debanne et al., 2011). Estos canales pueden regular algunas de las propiedades del potencial de acción, incluido el umbral de generación, o interferir en la excitabilidad neuronal a través de la activación de canales de potasio activados por calcio (Bender and Trussell, 2009; Bender et al., 2010; Yu et al., 2010).

Además de canales iónicos, la membrana del SIA está enriquecida con una variedad de proteínas de adhesión CAM (*cell adhesion molecules*) incluyendo dos miembros de la familia L1, **NF-186** (Neurofascina-186) y **NrCAM** (*Neuron glia-related CAM*). En la zona más distal del SIA también se encuentran otras CAM, como TAG-1, Caspr2 y ADAM22. Igualmente, la red perineuronal del SIA posee una matriz extracelular única, con una elevada concentración de proteoglicanos, como brevicanos, versicanos, agreganos y tenascina-R. Aunque se desconoce la función de estas proteínas se cree que participan en la estabilización sináptica (Ogawa and Rasband, 2008; Rasband, 2010, 2011).

Todas estas proteínas de membrana son ancladas al citoesqueleto por mediación de proteínas de anclaje y de citoesqueleto. **Ankirina G** pertenece a una familia de proteínas que funcionan de adaptadoras entre proteínas de membrana y la proteína de citoesqueleto β -espectrina. Ankirina G (480/270 KDa) se localiza

específicamente en segmentos iniciales y nodos de Ranvier (Kordeli et al., 1995) y contiene diferentes dominios de unión a membrana y a β -IV espectrina (Bennett and Healy, 2009). La asociación de esta última al citoesqueleto de actina permite que el complejo ankirina G/ β -IV-espectrina funcione como un puente de anclaje entre membrana y citoesqueleto en el SIA (Bennett and Gilligan, 1993; Berghs et al., 2000). **PSD-93** (*Postsynaptic density protein-93*) es otra proteína que aparece en el SIA formando un complejo macromolecular con Caspr2, TAG-1, ADAM22 y Kv1 (Ogawa et al., 2010).

Además de canales iónicos y proteínas de función estructural, en el segmento inicial se concentran determinadas quinasas como CK2, Cdk2/5 o CamKII que podrían regular el tráfico de proteínas hacia el SIA y/o la interacción entre ellas (Brechet et al., 2008; Hund et al., 2010; Vacher et al., 2011).

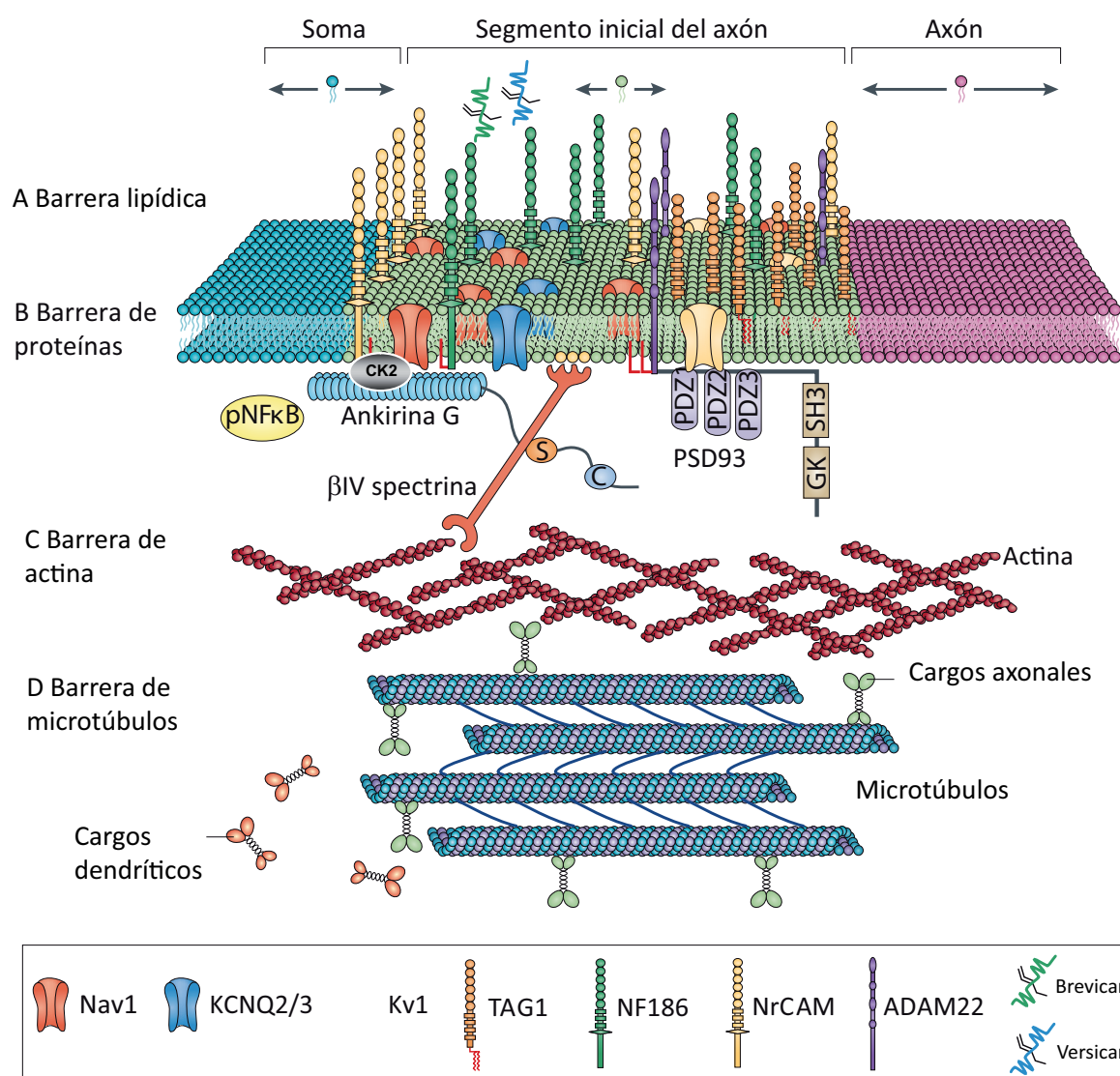


Figura 14. Estructura y composición del SIA. A-D Diferentes barreras en el SIA desde la membrana al citoplasma impiden la segregación dendrita-axón, responsable de la identidad neuronal. Imagen adaptada de Rasband, 2010.

Por debajo de este complejo entramado de proteínas de membrana, el segmento inicial del axón posee un citoesqueleto con características especiales, como un entramado rico en actina (Nakada et al., 2003). Además, la estructura microtubular del SIA es exclusiva de esta región (Palay et al., 1968) con una organización única de MT dispuestos en paquetes fasciculados y una serie de propiedades características asociadas, como una acumulación estable de EB1 (Nakata and Hirokawa, 2003) y EB3, que podrían coordinar la interacción

molecular y funcional entre ankirina G y los MT del SIA (Leterrier et al., 2011b). Por otro lado, se han observado alteraciones ultraestructurales en el segmento inicial de neuronas de ratones KO para ankirina G, los cuales están desprovistos de microtúbulos fasciculados (Sobotzik et al., 2009).

2.3 FORMACIÓN Y ANCLAJE DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

El ensamblaje del SIA es una propiedad intrínseca de las neuronas que, a diferencia de los nodos de Ranvier, no requiere la intervención de moléculas gliales o extracelulares (revisado en Susuki and Rasband, 2008). Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que ankirina G es la primera proteína en concentrarse en SIA, como principal organizador de la estructura del SIA durante el desarrollo y en etapas posteriores (Boiko et al., 2007; Hedstrom et al., 2008; Sobotzik et al., 2009). Ankirina G coordina el ensamblaje del segmento inicial sirviendo de andamio para un gran número de proteínas del SIA (Zhou et al., 1998; Jenkins and Bennett, 2001). De hecho, la supresión de ankirina G bloquea la polarización del canal de sodio Nav, canales KCNQ2/3, neurofascina, NrCAM y β -IV-espectrina (Hedstrom et al., 2007). Diversos grupos han identificado secuencias de unión a ankirina en el canal de sodio, en canales KCNQ2/3, y en otras proteínas como neurofascina NrCAM y β IV-espectrina (Garver et al., 1997; Garrido et al., 2003b; Lemaillet et al., 2003; Pan et al., 2006; Yang et al., 2007). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual ankirina G es reclutada al segmento inicial. En este sentido un estudio reciente propone que la quinasa **CK2** es esencial para la localización de ankirina G en el SIA, dado que la supresión de CK2 interfiere en el ensamblaje de ankirina G y canales de sodio (Sanchez-Ponce et al., 2011a).

Además de ankirina G, PSD-93 parece ser otra proteína fundamental en la organización del SIA, concretamente para el ensamblaje de canales Kv1 *in vitro*, si bien podrían existir mecanismos de compensación alternativos *in vivo* (Ogawa et al., 2008; Ogawa et al., 2010). Por otro lado, NF-186 contribuye al anclaje de la matriz extracelular que rodea al SIA por medio de la interacción con proteoglicanos condroitín sulfato (Hedstrom et al., 2007).

Por último, la fosforilación de algunas proteínas del SIA constituye un nivel adicional de regulación. La fosforilación, preferentemente en las secuencias de unión a ankirina G, determina la inserción y/o el tráfico polarizado al SIA de proteínas y canales. Es el caso de NF-186 y NrCAM, cuya interacción con ankirina G depende de fosforilación en tirosina (Garver et al., 1997). En una misma línea, la afinidad del canal de sodio por ankirina G es regulado por CK2 en la secuencia de inserción en segmento inicial (Brechet et al., 2008). Por otro lado, las quinasas Cdk2 y Cdk5 parecen regular la inserción y el tráfico canales Kv1 (Vacher et al., 2011).

2.4 EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN COMO BARRERA DE DIFUSIÓN- SEGREGACIÓN ENTRE AXÓN Y DENDRITAS

La existencia de una barrera física que impide la difusión de moléculas entre axón y dendritas constituye una solución alternativa al enorme gasto energético que supone el mantenimiento de la asimetría neuronal. El segmento inicial cumple la función de barrera de difusión entre ambos compartimentos, asegurando la segregación morfológica y funcional a varios niveles (**fig. I4**). A nivel de **membrana**, el segmento inicial posee una elevada densidad de proteínas que poseen determinadas modificaciones lipídicas (palmitoilación, preferentemente), pudiendo restringir la movilidad de lípidos y regular su localización específica (Kobayashi et al., 1992; Ren and Bennett, 1998; Winckler et al., 1999; Komada and Soriano, 2002; Lemmon et al., 2002; Nakada et al., 2003). Estas proteínas permanecen ancladas al citoesqueleto de actina, lo que impide su difusión y ayuda a consolidar la estructura en membrana. Por debajo de la membrana plasmática se ha demostrado

la existencia de otra barrera, a nivel del **citoplasma**, que regula selectivamente el paso de proteínas y cargos donde la integridad del citoesqueleto de actina juega un papel fundamental (Song et al., 2009). La formación de esta doble barrera sigue un proceso de maduración y se establece después del ensamblaje de ankirina G y canales de sodio (Song et al., 2009; Brachet et al., 2010). Finalmente, el citoesqueleto de MT asociado al SIA también participa en esta barrera de exclusión proteica a nivel del axoplasma, impidiendo el movimiento retrógrado hacia el soma de Tau, y participando, por tanto, en la segregación de proteínas MAP en ambos compartimientos (Li et al., 2011c). Asimismo, el citoesqueleto de MT contribuye igualmente al filtrado de moléculas hacia los axones, como estación de clasificación para el tráfico de proteínas (Nakata and Hirokawa, 2003; Hirokawa and Takemura, 2005).

La integridad de esta doble barrera es fundamental para el mantenimiento de la polaridad neuronal y la supresión de ankirina G, directamente responsable del mantenimiento y ensamblaje del SIA, conlleva la desestructuración de este dominio a nivel de citoesqueleto y proteínas de membrana (Hedstrom et al., 2008; Sobotzik et al., 2009; Song et al., 2009). Así pues, el SIA puede definirse como una estructura cuya complejidad y organización aumenta de acuerdo al nivel de maduración neuronal. Sin embargo, investigaciones recientes permiten una visión más dinámica del SIA al definir procesos de plasticidad en respuesta a cambios en su actividad (Grubb and Burrone, 2010; Kuba et al., 2010).

2.5 PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Existen diversos trastornos neurológicos asociados a alteraciones del segmento inicial o a sus proteínas asociadas. Varios genes que codifican para canales de sodio y potasio, o para sus subunidades auxiliares, son factores de riesgo en el desarrollo de diversos tipos de epilepsia, lo que sugiere que el SIA puede ser un sitio de convergencia funcional en la patogénesis de esta enfermedad (Wimmer et al., 2010; Oakley et al., 2011). El gen ANK3, que codifica para ankirina G, es un factor de riesgo común en trastornos como la esquizofrenia y el desorden bipolar (Ferreira et al., 2008; Schulze et al., 2009), y su expresión, anormalmente incrementada, se ha detectado en trastornos del desarrollo neurológico como el síndrome de Angelman (Kaphzan et al., 2011). Distintas proteínas comunes a nodos de Ranvier y SIA se han relacionado con neuropatologías de origen autoinmune, como por ejemplo la esclerosis múltiple (Mathey et al., 2007). Por otro lado, la proteólisis en respuesta a una lesión neuronal inducida por isquemia se ha demostrado que afecta específicamente a la integridad estructural del SIA (Schafer et al., 2009).

3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN LA POLARIDAD NEURONAL

3.1 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR

En las últimas décadas se han descubierto una serie de moléculas que actúan asimétricamente en las neuronas y pueden regular el proceso de polaridad. Es el caso de las proteínas Par3-Par6 (*partitioning defective*) que junto con aPKC (*atypical protein kinase C*), forman un **complejo de polaridad** que se concentra en el futuro axón durante la transición entre estadio 2 y 3 (Shi et al., 2003). Otras proteínas Par, como son Par4 o LKB1 (*liver kinase B1*) y SAD quinasas A y B, tienen un claro papel en polaridad neuronal *in vivo* (Asada et al., 2007; Barnes et al., 2007). Por último, las **GTPasas de la familia de Rho** y sus efectores son también críticos reguladores del citoesqueleto de actina (revisado en Govek et al., 2005) y están implicados en el establecimiento de la polaridad neuronal (Arimura and Kaibuchi, 2007).

Una de las vías clave en el establecimiento de la polaridad neuronal es la ruta de **PI3K** (*phosphoinositide*

3-kinase) donde su activación polarizada en el extremo de una neurita es necesaria para la especificación de un axón (Shi et al., 2003; Menager et al., 2004). Estos trabajos postulan que el reclutamiento y activación del complejo de polaridad PAR3-PAR6-aPKC es regulado por efectores de la vía de PI3K. Proteínas con dominio PH (*pleckstrin homology*) se unen a PIP_3 con alta afinidad (Frech et al., 1997) y por lo tanto, la actividad de PI3K recluta este tipo de factores a la membrana plasmática. Es el caso de Akt que, tras su activación por fosforilación en membrana, puede regular factores clave en polaridad neuronal como es el caso de GSK3 (Jiang et al., 2005). **GSK3** (*glycogen synthase kinase 3*) es una serina-treonina quinasa implicada en numerosos procesos celulares (revisado en Rayasam et al., 2009). Posee dos isoformas GSK3 α y GSK3 β , ésta última presente en 2 variantes de *splicing* (GSK3 β 1 y GSK3 β 2) donde GSK3 β 2 se expresa mayoritariamente en cerebro (Woodgett, 1990; Mukai et al., 2002). Esta quinasa es constitutivamente activa y se regula principalmente por dos mecanismos: por fosforilación inhibitoria en serinas (S21 en GSK3 α y S9 en GSK3 β) y por interacción proteína-proteína en la ruta de Wnt. Tras la señalización mediada por receptores, efectores de la ruta de PI3K inactivan por fosforilación a GSK3. Aunque GSK3 puede actuar de sustrato para otras quinasas (Pearce et al., 2010), está ampliamente aceptado que Akt es su principal regulador. Por otro lado, GSK3 forma un complejo citosólico con componentes de la ruta de Wnt donde, en último término, regula la fosforilación de β -catenina. Bajo la señalización de Wnt el complejo se desarma y mantiene GSK3 inactiva.

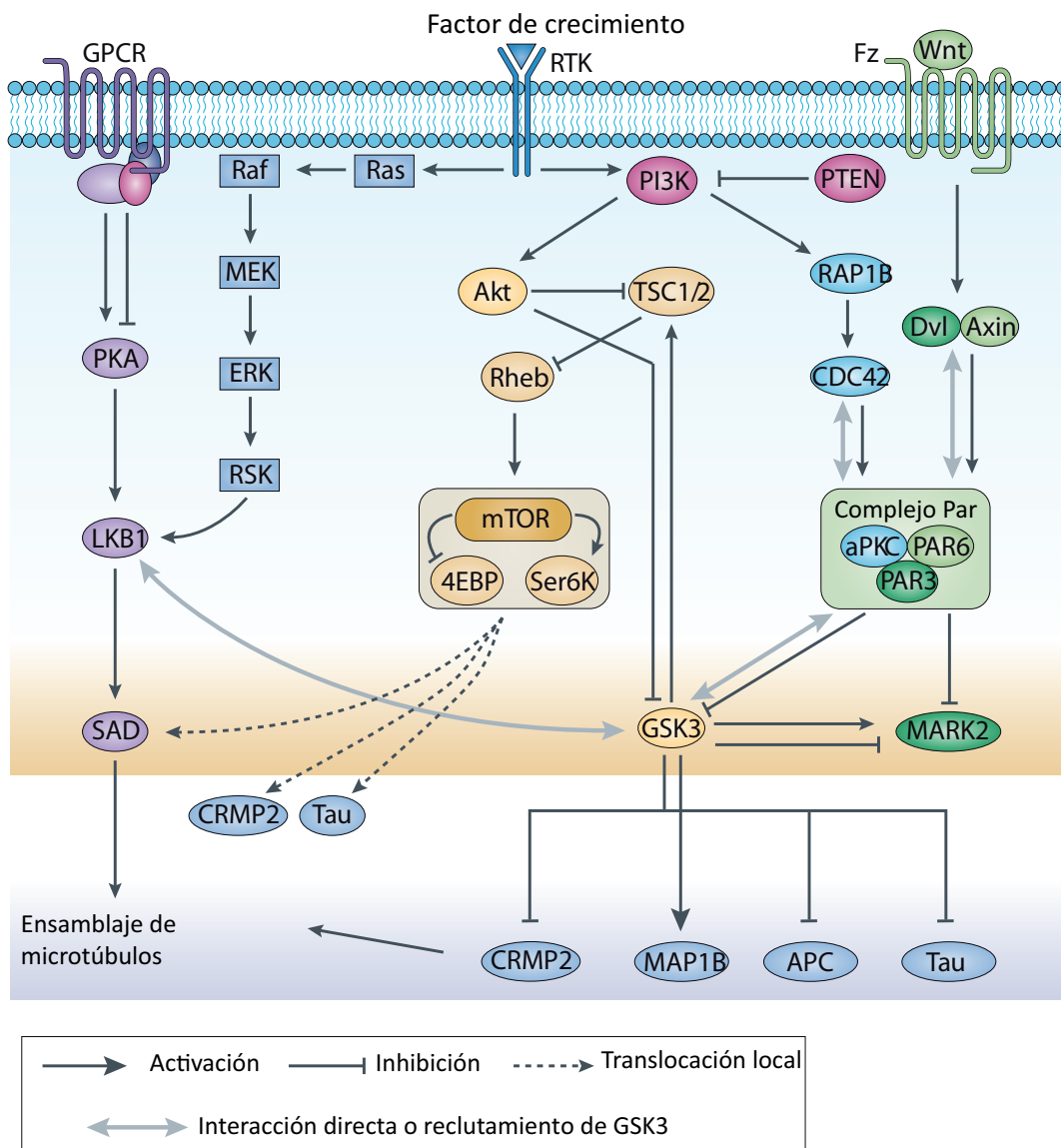


Figura 15. La quinasa GSK3 en la regulación de la polaridad neuronal. Imagen adaptada de Hur and Zhou, 2010.

En los últimos años diversos trabajos confirman que la actividad de GSK3 es necesaria para la especificación axonal (revisado en Kim et al., 2011). Por un lado, varios trabajos demuestran, mediante el empleo de inhibidores específicos, que la inhibición de GSK3 durante las primeras 24 horas en cultivo bloquea el proceso de especificación axonal (Garrido et al., 2007), mientras que su inhibición posterior produce un fenotipo multiaxonal (Jiang et al., 2005), o ramificado (Garrido et al., 2007). Por otro lado, la inhibición local de GSK3 en el axón nascente es vital para el transporte polarizado y la correcta localización de PAR3 (Shi et al., 2004). Además, la inactivación de GSK3 parece tener un papel en el control de la polarización neuronal por debajo del complejo Cdc42-Par3/6 (Hur and Zhou, 2010), de Wnt-DVL-PKC ζ (Zhang et al., 2007a), y en la activación de la síntesis proteica dependiente de mTOR (Inoki et al., 2006) (fig. 15).

3.2 SEÑALES EXTRACELULARES QUE DIRIGEN LA POLARIDAD NEURONAL

Las neuronas de hipocampo *in vitro* se polarizan en ausencia de señales externas (Craig and Banker, 1994) lo que indica que la ruptura de la simetría es una propiedad intrínseca de estas neuronas. Sin embargo, en un contexto real, *in vivo*, la señalización extracelular puede modular el proceso de polarización (Arimura and Kaibuchi, 2007). Moléculas de la matriz extracelular y de adhesión celular parecen estar implicadas en la señalización para iniciar la especificación axonal (Esch et al., 1999; Menager et al., 2004). Neurotrofinas y netrinas también se han propuesto como reguladores del mismo proceso (Da Silva et al., 2005; Adler et al., 2006). Otros factores como BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) inician una cascada de señalización activando PKA que finalmente actúa sobre la dinámica de MT y la formación del axón (Shelly et al., 2007; Barnes et al., 2008). La proteína de secreción, Wnt, también puede inducir polaridad neuronal y crecimiento axonal (Hilliard and Bargmann, 2006; Prasad and Clark, 2006). En conjunto, existe una compleja señalización extracelular que modula el proceso de polarización neuronal (revisado en Barnes and Polleux, 2009).

En este escenario, el citoesqueleto neuronal constituye pues el punto donde convergen todas las señales, como último efector en los procesos de diferenciación y posterior maduración neuronal.

4. CITOESQUELETO NEURONAL

El citoesqueleto es un sistema filamentoso de proteínas interconectadas que intervienen en la morfogénesis neuronal. Sus componentes fundamentales son: los microfilamentos de actina (MF), los microtúbulos (MT) y los filamentos intermedios.

4.1 CITOESQUELETO DE ACTINA Y MICROTÚBULOS

Los MF consisten en dos cadenas helicoidales entrelazadas de F-actina, creados a partir de la polimerización de monómeros globulares de actina-G. Estos MF están polarizados y presentan un extremo de crecimiento rápido (+), polimerización de actina-G, y un extremo de despolimerización (-) (revisado en Pollard and Borisy, 2003). A través de receptores transmembrana, las señales extracelulares regulan la actividad de un grupo de moduladores centrales del citoesqueleto de actina, las GTPasas de la familia de Rho (Etienne-Manneville and Hall, 2002).

Los MT son polímeros proteicos cilíndricos no-covalentes de tubulina, que se disponen en paquetes o haces en paralelo a lo largo de axones y dendritas. Se componen de heterodímeros estables de α/β -tubulina que se asocian para dar lugar a estructuras polarizadas con un extremo de crecimiento rápido (+, *plus-end*) y otra de crecimiento lento (-, *minus-end*). Una propiedad característica de los MT es su capacidad de sufrir

ciclos rápidos de crecimiento y retracción, proceso conocido como inestabilidad dinámica, lo que permite a la célula reorganizarse rápidamente cuando es necesario (Burbank and Mitchison, 2006; Conde and Cáceres, 2009) (**fig. 16**). En neuronas, la organización de MT difiere entre dendritas y axones. Los MT axonales están uniformemente orientados con sus extremos (+) hacia los conos distales, mientras que en dendritas los MT poseen una orientación mixta (Baas et al., 1989). Otra diferencia sustancial es la composición de proteínas asociadas a microtúbulos MAPs (*microtubule associated protein*) o motores moleculares.

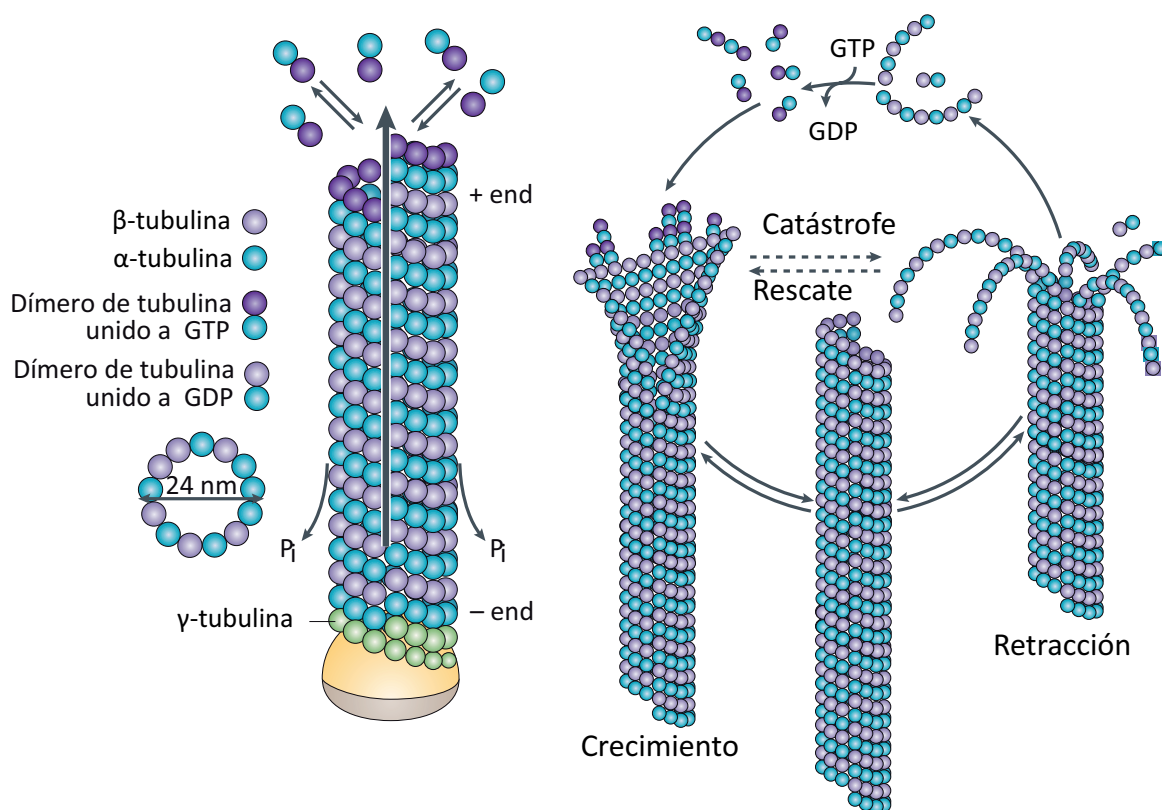


Figura 16. Microtúbulos, inestabilidad dinámica. En una población de microtúbulos en cualquier punto en el tiempo, un subconjunto de MT crece rápidamente mientras que otros se contraen. Esta combinación de crecimiento, contracción y transiciones rápidas entre ambas se conoce como inestabilidad dinámica. La inestabilidad dinámica permite a la célula reorganizarse rápidamente el citoesqueleto cuando es necesario. Los microtúbulos se componen de subunidades de tubulina unidas a GTP. La célula consume energía para mantener una concentración elevada de GTP-tubulina, por encima de la concentración crítica para la polimerización lejos del equilibrio, de modo que las subunidades rápidamente se asocian a los extremos finales y los microtúbulos crecen. Después de que se incorporen las subunidades el GTP es hidrolizado a GDP liberando energía. Parte de esta energía se emplea en deformar la subunidad de tubulina cambiando a un estado curvado, más estable. Esto ejerce presión sobre el microtúbulo que se abre hacia fuera. Sin embargo, la tubulina-GDP no puede adquirir esa conformación curvada mientras se encuentre incluida en la superficie del MT, ya que el estado curvado sólo se produce en los extremos finales del MT. La energía almacenada en las subunidades de tubulina se libera en el momento de retracción rápida. Imagen adaptada de Conde and Cáceres, 2009; texto adaptado de Burbank and Mitchison, 2006.

El citoesqueleto de actina y microtúbulos posee unas propiedades funcionales únicas para determinar y regular la polaridad. El cono de crecimiento axonal es una estructura de vital importancia para la formación del axón, como estructura que soporta el crecimiento mediante la detección y transducción al citoesqueleto de señales extracelulares (Geraldo and Gordon-Weeks, 2009). Se compone de una región central llena de orgánulos y microtúbulos y un dispositivo periférico muy dinámico rico en actina. Antes de la polarización,

el futuro axón muestra una mayor dinámica en el cono de crecimiento y un mayor volumen en el recambio de actina, formando una estructura de actina permisiva para los microtúbulos salientes. Por el contrario, en el futuro cono de crecimiento dendrítico los filamentos de actina forman una barrera para la profusión de MT (Bradke and Dotti, 2000; Tahirovic and Bradke, 2009). De hecho, el tratamiento de neuronas en cultivo con un compuesto que impide la polimerización de actina, citocalasina D, produce neuronas con múltiples axones (Bradke and Dotti, 1999). Por lo tanto, el citoesqueleto de actina regula la forma y el crecimiento del cono, mientras que los MT dan estructura al eje del axón y son esenciales para su extensión. El control de la dinámica de MT en este contexto constituye otro factor determinante en el proceso de polarización.

4.2 MICROTÚBULOS Y MORFOGÉNESIS NEURONAL

Los procesos de nucleación, dinámica y transporte de MT juegan un papel crítico a lo largo de las diferentes etapas de la morfogénesis neuronal (**fig. 17**). Los MT neuronales son generados en el centrosoma o MTOC (*microtubule-organizing center*) por nucleación. Éste se compone de dos centriolos dispuestos perpendicularmente rodeados de una matriz proteica denominada material pericentriolar. Los MT son entonces liberados por la proteína de corte katanina y transportados como polímeros cortos a las neuritas durante el inicio de la diferenciación neuronal (Baas and Buster, 2004). Sin embargo, el centrosoma pierde su capacidad para la nucleación de MT después de la axonogénesis, lo que implicaría la existencia de algún mecanismo acentrosomal de nucleación de MT en etapas posteriores de desarrollo (Baas et al., 2006; Stiess and Bradke, 2010; Stiess et al., 2010). Durante los últimos años se ha postulado que la posición del centrosoma podría determinar el lugar de inicio del axón, sin embargo, discrepancias con otros modelos *in vitro* e *in vivo* han generado una gran controversia (revisado en Kuijpers and Hoogenraad, 2011). Estudios más recientes *in vivo* ponen de manifiesto que el punto de axonogénesis no viene determinado por la posición del centrosoma (Distel et al., 2010) mientras que, trabajos realizados en *Drosophila* postulan que vestigios o restos de la última división mitótica, en etapas precursoras, podrían determinar el punto de asimetría (Pollarolo et al., 2011).

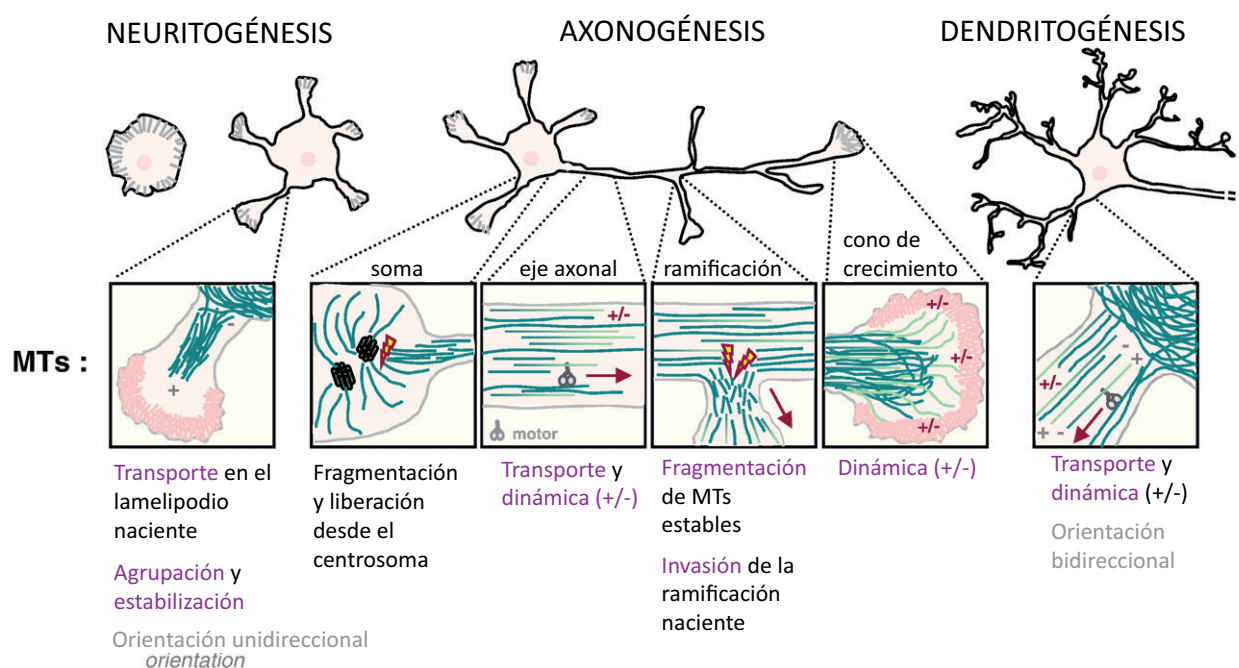


Figura 17. Reorganización de MT durante la morfogénesis neuronal. Imagen adaptada de Poulain et al., 2010.

El papel esencial de la estabilidad de los MT en el proceso de especificación axonal se ha demostrado recientemente (Witte et al., 2008), donde el empleo de agentes como el taxol, agente estabilizador de MT, confirma que la estabilización de MT en una única neurita precede a la formación del axón. Para la elongación del axón se necesita un aporte neto de MT. En este sentido, diversos estudios sugieren la participación de dos mecanismos fundamentales: el ensamblaje local de MT en la región distal del axón (Yu et al., 1996) y el transporte de MT preensamblados hacia las zonas distales del axón (Wang and Brown, 2002), a través de un mecanismo que involucra proteínas de corte y transporte mediado por kinesinas y dineínas (Baas et al., 2006). En definitiva, el alargamiento del axón se basa en una estrecha coordinación de transporte, dinámica y estabilización de MT.

4.3 REGULACIÓN DE LA DINÁMICA DE MICROTÚBULOS

La dinámica de MT es regulada por una variedad de factores intrínsecos y extrínsecos. En el primer grupo se incluyen las modificaciones posttraduccionales de tubulina, como características internas y esenciales de los MT. Las proteínas de asociación con MT, quinasas y un gran número de drogas antimitóticas se enmarcarían dentro del segundo grupo. En esta sección repasaremos las principales proteínas así como las quinasas más relevantes implicadas en la dinámica de los MT.

4.3.1 Proteínas que regulan la dinámica de microtúbulos

Un considerable número de proteínas reguladoras de MT han sido identificadas, actuando directamente sobre MT para estabilizar, despolimerizar o fragmentar su estructura, modulando su dinámica de crecimiento (fig. 18).

Las **MAPs** son proteínas asociadas a MT que regulan su polimerización y estabilización, y por lo tanto, son uno de los factores extrínsecos que modulan el proceso de inestabilidad dinámica. Se pueden dividir en tres familias, MAP1, MAP2 y tau. La familia MAP2 se divide en dos grupos: de alto peso molecular que incluye MAP2A y MAP2B, expresadas específicamente en soma y dendritas; y de bajo peso molecular MAP2C y MAP2D presentes también en células gliales y en todos los compartimentos neuronales. MAP2 y tau son capaces de estabilizar MT, incrementar su rigidez y promover su nucleación. MAP1B es altamente expresada durante el desarrollo temprano y, al igual que tau, está enriquecida en axones. Ambas son necesarias para la formación del axón. La afinidad de las MAPs por la tubulina depende de su estado de fosforilación, proceso regulado por diversas quinasas y fosfatasas (Avila et al., 1994; Dehmelt and Halpain, 2005; Halpain and Dehmelt, 2006; Poulain and Sobel, 2010).

Las proteínas **+TIP** (*plus-end tracking proteins*) se asocian, y específicamente se acumulan, en los extremos + de los MT permitiendo el control de su dinámica e interacciones con componentes de la corteza celular. De entre las más representativas CLIPs, CLASP, APC y EB1 están involucradas en el control de la morfogénesis neuronal. APC (*poliposis adenomatosa coli*) es una proteína multidominio que estabiliza los MT y parece promover su ensamblaje tanto *in vitro* como *in vivo* (Kita et al., 2006). EB1 se ha encontrado a lo largo de los MT estabilizando los extremos + (Sandblad et al., 2006). Otras proteínas relacionadas con la dinámica de MT son las proteínas de corte katanina y espastina, encargadas del remodelado de MT durante la morfogénesis neuronal. La kinesina KIF2 está involucrada en la regulación de las ramificaciones colaterales axonales, y se acumula en los conos de crecimiento provocando la despolimerización de MT (Hirokawa and Noda, 2008). Otra proteína, CRMP-2, se une a los dímeros de tubulina y promueve el ensamblaje de MT aumentando su tasa de crecimiento (Fukata et al., 2002).

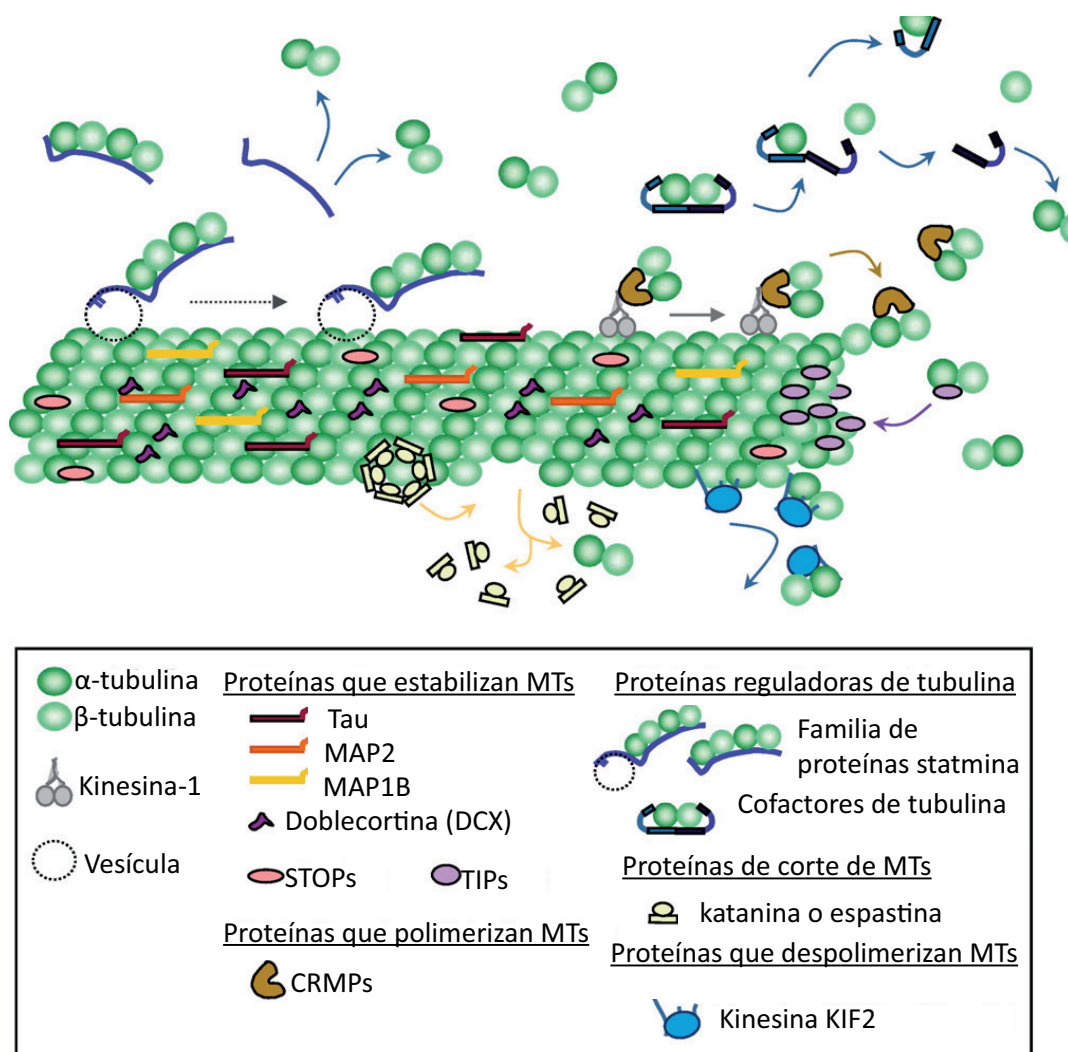


Figura 18. Proteínas reguladoras de MT en neuronas. Imagen adaptada de Poulain et al., 2010.

Existe una amplia variedad de fármacos que modulan la dinámica del citoesqueleto de MT, y suelen emplearse por su potencial antimitótico en cáncer. Entre ellos, el **nocodazol** es un fármaco que inhibe la polimerización de unidades libres de tubulina y a concentraciones estequiométricas suprime el proceso de inestabilidad dinámica. El **taxol**, por el contrario, estabiliza los MT y estimula su polimerización, uniéndose preferentemente a la región N-terminal de la β-tubulina en la superficie del MT (Vasquez et al., 1997; Wilson et al., 1999).

4.3.2 Quinasas implicadas en la regulación de los microtúbulos

La quinasa **GSK3**, además de participar en diferentes vías de señalización implicadas en procesos de polaridad neuronal, es un modulador fundamental de la dinámica de MT, dado que regula el estado de fosforilación de determinadas MAPs. Entre ellas se incluyen CRMP2, APC, MAP1B y tau. La fosforilación de CRMP2 impide su unión a dímeros de tubulina y, en consecuencia, impide la polimerización de MT (Yoshimura et al., 2005). Del mismo modo, la actividad de GSK3 sobre APC, tau y MAP1B impide su unión a MT y afecta a su ensamblaje (Zumbrunn et al., 2001). La inhibición de la actividad de GSK3, bajo la señalización de PI3K, parece fundamental durante el proceso de especificación axonal para promover la estabilización y polimerización

de MT. Sin embargo, el modo de acción de GSK3 durante el proceso de elongación axonal parece ser algo más complejo. Sustratos de GSK3 como APC o CRMP2 requieren la fosforilación previa o el *priming* de otra quinasa, a diferencia de MAP1B, lo que ha llevado a determinados grupos a proponer un modelo en el que los diferentes sustratos de GSK3 son diferencialmente regulados, para modular la morfogénesis axonal (Kim et al., 2006). Durante la elongación axonal, cuando GSK3 es completamente inhibida, los MT son excesivamente estabilizados y pierden su dinamismo, dando lugar a una interrupción del crecimiento axonal. Por lo tanto, una estrecha regulación de la actividad GSK3 es necesaria para modular la elongación axonal.

Además de GSK3, otras quinasas participan en la regulación de la dinámica de microtúbulos. Cdk5, es capaz de fosforilar muchas proteínas reguladoras de MT, e interviene en el mantenimiento axonal, regulando el avance y motilidad del cono de crecimiento en procesos claves de neuritogénesis y polaridad neuronal (Hahn et al., 2005). JNK (*c-jun NH2-terminal kinase*) es otro modulador de la red de MT que actúa sobre MAPs (Tararuk et al., 2006). La actividad de CaMKII y ERK se ha visto interviene en la extensión axonal y en el crecimiento dendrítico, incrementando la unión de MAP2 a MT (Vaillant et al., 2002; Wayman et al., 2004). La proteína CK2 (*casein kinase 2*) también participa en el control de citoesqueleto y dinámica de los microtúbulos, pudiendo regular la fosforilación de MAP1B (Canton and Litchfield, 2006).

4.4 MODIFICACIONES POSTTRADUCCIONALES DE TUBULINA

Las tubulinas α y β son codificadas por múltiples genes, de los cuales, sólo unos pocos son expresados en cerebro, cambiando su nivel de expresión a lo largo del desarrollo. Es el caso de $\alpha 4A$, $\beta 3$, $\beta 4$ -tubulina que aumentan su expresión durante el desarrollo cerebral postnatal. Esta gran variabilidad en los subtipos de tubulinas y su composición molecular sugiere la existencia de un código de tubulinas, responsables de la versatilidad funcional de diferentes estructuras de MT (cilios, uso mitótico...) (Verhey and Gaertig, 2007). Por otro lado, las regiones C-terminal de α/β -tubulina descansan en la superficie del microtúbulo y son aceptoras de modificaciones posttraduccionales (PTM, *post-translational modifications*) como tirosinación, detirosinación, modificación $\Delta 2$, poliglicilación, poliglutamilación, fosforilación y palmitoilación. La acetilación es la única PTM que no se produce en la región C-terminal. Estas modificaciones están involucradas en la unión de proteínas, y se distribuyen según patrones diferenciales a lo largo de dendritas, axones y orgánulos microtubulares, (Hammond et al., 2008; Fukushima et al., 2009; Janke and Kneussel, 2010) (fig. 19).

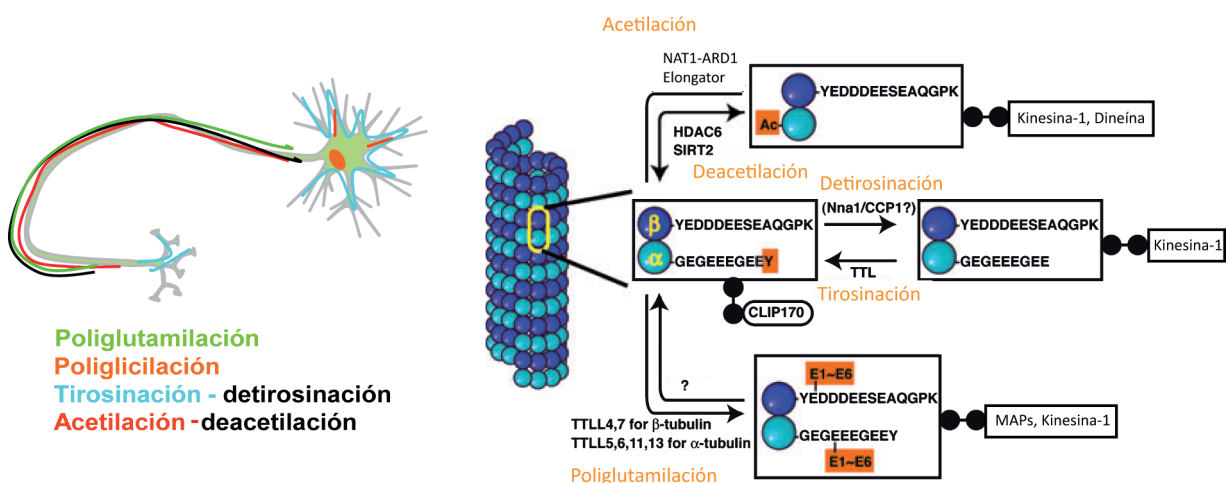


Figura 19. Modificaciones posttraduccionales de tubulina en neuronas. Imagen adaptada de Fukushima et al., 2009.

4.4.1 Tirosinación/detirosinación/ modificación $\Delta 2$

La gran mayoría de α -tubulinas contienen un residuo tirosina en el extremo C-terminal, inmediatamente después de la traducción. **Tyr-T** (*Tyrosinated Tubulin*, tubulina tirosinada) forma heterodímeros con β -tubulina y es ensamblada en los MT (Gundersen et al., 1987). Al cabo del tiempo es detirosinada en los MT dando lugar a **deTyr-T** (*detyrosinated tubulin*, tubulina detirosinada), que expone un ácido glutámico en la región C-terminal, por lo que a menudo se refieren a ella como Glu-tubulina o Glu-T. DeTyr-T está presente en MT estables de larga vida media, mientras que Tyr-T aparece en MT de formación reciente. $\Delta 2$ -tubulina se limita a MT muy estables que se encuentran en una etapa final de diferenciación funcional (Paturle-Lafanechere et al., 1994). En neuronas, la tubulina tirosinada está principalmente localizada en la región distal del axón y en conos de crecimiento, mientras que la tubulina detirosinada se concentra en el eje más proximal axonal. Dada la localización diferencial de ambas tubulinas, es probable que cada modificación pueda jugar un papel distinto en la función de MT. A pesar de que los polímeros de MT no son estabilizados por detirosinación de tubulina *per se* (Khawaja et al., 1988), son menos susceptibles a la despolimerización por kinesina 13, la cual, unida a MT puede incrementar la tasa de catástrofe en un proceso ATP-dependiente (Peris et al., 2009).

4.4.2 Poliglicilación y poliglutamilación

La generación enzimática de fracciones de glicina o glutamato en la región C-terminal de α/β -tubulina da lugar a dos nuevas PTM: poliglicilación y poliglutamilación. Ambas aparecen en cilios y flagelos de células mamarias, mientras que la poliglutamilación es una modificación que puede encontrarse además en la mayoría de MT neuronales (Janke and Kneussel, 2010).

4.4.3 Acetilación

La acetilación es otra modificación que, a diferencia de las anteriores, se establece en la lisina 40 de la α -tubulina, preservada en todas sus isoformas. Esta lisina aparece localizada en el interior o lumen del polímero del microtúbulo (Nogales et al., 1998), mientras que la mayoría, aunque no todas, de las interacciones entre MT y proteínas se establecen en la superficie del cilindro microtubular. En neuronas la Ac- α -T (*Acetylated tubulin*, tubulina acetilada) está enriquecida en la región proximal del axón y está presente en menor cantidad en soma y conos de crecimiento (Baas and Black, 1990; Brown et al., 1993). Un estudio cuantitativo realizado por el grupo del Dr. Bradke demostró que la relación Ac- α -T versus Tyr-T era mayor en la neurita que se define posteriormente como axón comparado con el resto de neuritas (Witte et al., 2008), postulando así que la estabilidad de MT es un factor clave para la especificación axonal. Por otro lado, aunque la acetilación aparece en MT estables y de larga vida media, sigue siendo un gran foco de debate si la acetilación *per se* es responsable de conferir mayor estabilización a los MT (Maruta et al., 1986; Piperno et al., 1987; Schulze et al., 1987; Palazzo et al., 2003; Hammond et al., 2010). Aunque finalmente se acepta que la acetilación por sí sola no confiere una mayor estabilidad al polímero del MT, se ha propuesto que la acetilación de α -tubulina, en asociación con otras modificaciones, podría regular la dinámica de unión de proteínas como MAPs o motores moleculares (Maruta et al., 1986; Palazzo et al., 2003; Perdiz et al., 2011). Se han sugerido diversos mecanismos, como por ejemplo algún cambio conformacional del dímero de tubulina, o la existencia de puntos calientes a lo largo de la estructura del microtúbulo para permitir el paso de proteínas entre el compartimiento interior del MT y el citoplasma circundante (Perdiz et al., 2011).

Hasta hace unos años no se han identificado algunas de las enzimas responsables de la acetilación de α -tubulina, lo que explica el estudio preferente de enzimas deacetilasas en la mayoría de estudios funcionales publicados hasta la fecha. Entre ellas, podemos destacar α TAT1 (Shida et al., 2010), MEC17 (Akella et al., 2010) o los complejos Elongator (Creppe et al., 2009) y ARD1-NAT1 (Ohkawa et al., 2008), que parecen estar implicados no sólo en acetilación, sino en funciones relacionadas con migración y ramificación neuronal. HDAC6 (histona deacetilasa 6) y SIRT2 (sirtuina 2) son las dos enzimas encargadas de la eliminación del grupo acetilo de la α -tubulina (Hubbert et al., 2002; North et al., 2003) y por lo tanto, de su deacetilación. Ambas muestran una localización citoplasmática, colocalizan con MT y su inhibición farmacológica o la reducción de su expresión aumentan los niveles de Ac- α -T en células. Sin embargo, mientras que HDAC6 se expresa en la mayoría de las neuronas y es abundante en cerebelo, SIRT2 se encuentra en oligodendrocitos y en vainas de mielina (Southwood et al., 2007).

4.5 MOTORES MOLECULARES, KINESINAS

Los motores moleculares que intervienen en el transporte intracelular se agrupan principalmente en tres grandes superfamilias: kinesinas, dineínas y miosinas. Las kinesinas o KIFs (*Kinesin superfamily proteins*) utilizan los MT como carriles para el transporte, mayoritariamente anterógrado, de cargos. Las kinesinas se agrupan en 15 familias (de kinesina 1 a 14B) y se clasifican en tres grupos dependiendo de la posición de su dominio motor en N, M o C. Entre ellas, kinesinas como KIF1, KIF3, KIF5 y KIF13B se encargan mayoritariamente del transporte axonal, mientras que otras como KIF17 se ocupan del transporte de cargos hacia las dendritas (Hirokawa et al., 2010).

La kinesina 1 o KIF5 es una kinesina que generalmente se mueve hacia los + end de los MT y engloba tres subtipos: KIF5A, KIF5C y KIF5B. El complejo motor de KIF5 se compone de dímeros conocidos como KHC (*kinesin heavy chain*) que pueden formar tetrámeros reclutando dos cadenas ligeras KLC (*kinesin light chain*). Aunque KIF5 no es una kinesina exclusiva del transporte axonal, desempeña un papel fundamental en el axón, transportando mitocondrias, precursores de vesículas sinápticas, orgánulos de membrana y cargos mediados por JIP (*c-jun NH2-terminal kinase (JNK)-interacting proteins*). Estudios recientes sugieren que el transporte mediado por kinesinas está involucrado en la especificación de un solo axón (Jacobson et al., 2006), sugiriendo que la asociación de KIF5 con MT específicos axonales podría ser un factor determinante para el transporte direccional y la polaridad neuronal (Nakata and Hirokawa, 2003; Witte et al., 2008). No obstante, se desconocen los mecanismos moleculares que dirigen el transporte diferencial de kinesinas hacia axones y dendritas. Recientemente se ha postulado que la cantidad de tubulina-GTP puede crear puntos calientes para la aparición de determinadas modificaciones posttraduccionales de tubulina, que podrían dirigir el tráfico diferencial de kinesinas (Nakata et al., 2011). Finalmente, la diferencia en la relación tubulina tirosinada/tubulina detirosinada entre soma y axón ha sido propuesto como un nuevo mecanismo para dirigir específicamente a KIF5 hacia el axón (Konishi and Setou, 2009).

5. HISTONA DEACETILASA 6, HDAC6

Las HDACs o histona deacetilasas se describieron inicialmente como reguladoras de la acetilación de histonas y, por lo tanto, reguladoras de la estructura y función de la cromatina. Las clases I, II y IV son enzimas zinc-dependientes, mientras que la clase III (sirtuinas) utilizan NAD⁺ como cofactor. Cada tipo de HDAC muestra diferentes localizaciones subcelulares. Las de clase I se localizan principalmente en el núcleo, mientras que

algunos miembros de la clase II pueden alternar entre núcleo y citoplasma (revisado en Boyault et al., 2007; Valenzuela-Fernandez et al., 2008). HDAC6, miembro de la clase II, es una enzima principalmente citoplásmica y, dado su repertorio de sustratos, puede desempeñar funciones únicas entre las HDACs.

5.1 ORGANIZACIÓN EN DOMINIOS Y CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES

La proteína HDAC6 se compone de 1.215 residuos (*Homo sapiens*) o 1.152 residuos (*Mus musculus*), y es la única HDAC que contiene dos dominios deacetilasa DD1 y DD2 (Grozinger et al., 1999; Verdel and Khochbin, 1999). Por el momento se desconoce la función de esta duplicidad, y se ha generado gran controversia en un intento de averiguar cómo afecta al conjunto de la actividad deacetilasa cada uno de los dominios. Sin embargo, en lo que respecta a la actividad TDAC (tubulina deacetilasa) total, el segundo dominio parece tener un papel determinante (Haggarty et al., 2003; Zhang et al., 2003; Zou et al., 2006). Aunque puede encontrarse en núcleo bajo determinadas condiciones (Verdel et al., 2000) HDAC6 es activamente retenida en citoplasma. Una fuerte señal de exportación nuclear (NES), impide su acumulación en núcleo, mientras que un dominio SE14 actúa como una señal de retención en citoplasma (Bertos et al., 2004). Aunque el dominio de repetición SE14 se describió en la proteína HDAC6 humana, una secuencia parcialmente homóloga también está presente en ratones (Yang and Seto, 2008). Otro aspecto destacable de HDAC6 es la presencia de un dominio ZnF-UBP, presente en un grupo de proteínas USP (*ubiquitin-specific proteases*). Este dominio tiene la particularidad de unir específicamente cadenas de mono y poli-ubiquitina (Seigneurin-Berny et al., 2001; Hook et al., 2002) (**fig. I10**).

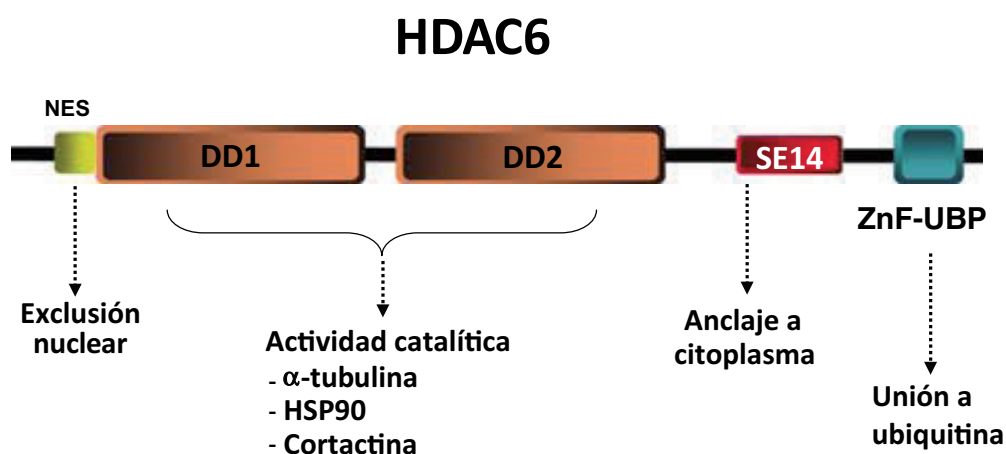


Figura I10. Estructura en dominios de HDAC6. Imagen adaptada de Boyault et al., 2007.

5.2 FUNCIONES DE HDAC6

HDAC6 es una enzima citoplásmica que regula muchos procesos biológicos importantes que dependen de la red de MT, incluidos: migración celular, transporte intracelular y degradación de proteínas mal plegadas. Así pues, HDAC6 parece funcionar en la encrucijada de, al menos, dos sistemas celulares de señalización que involucran acetilación de proteínas y ubiquitinación.

5.2.1 Funciones de HDAC6 dependientes de su actividad deacetilasa

HDAC6 participa en diversas funciones a través de la deacetilación de múltiples sustratos, como por ejemplo: histonas, α -tubulina, cortactina o HSP90. Aunque diversos reguladores transcripcionales como NF κ B α pueden reclutar HDAC6 a núcleo (Boyault et al., 2007) y, a pesar de demostrar una fuerte actividad deacetilasa sobre histonas *in vitro*, no se han encontrado evidencias de su actividad deacetilasa sobre histonas *in vivo* (Haggarty et al., 2003; Zhang et al., 2003). De hecho, α -tubulina fue el primer sustrato fisiológico identificado de HDAC6 (Hubbert et al., 2002; Matsuyama et al., 2002). Si bien significó un paso importante para la comprensión de los mecanismos que controlan la acetilación de tubulina, la primera consecuencia funcional de la actividad TDAC (tubulina deacetilasa) de HDAC6 no llegó hasta años después, cuando Reed y colaboradores mostraron que la inhibición de HDAC6 aumentaba los niveles de Ac- α -tubulina y promovía el transporte a neuritas de JIP1, una proteína que sirve de puente entre los cargos y la kinesina-1 (Reed et al., 2006). Así pues, la actividad TDAC de HDAC6 parece importante en el tráfico intracelular dependiente de MT, que repercute en el transporte de mitocondrias y el receptor EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (Chen et al., 2010; Gao et al., 2010). En este sentido, diversos estudios han empleado inhibidores de HDAC6 para mejorar el tráfico deficiente de BDNF en la enfermedad de Huntington (Dompierre et al., 2007), o la pérdida del transporte axonal en el síndrome de Charcot-Marie Tooth (d'Ydewalle et al., 2011), donde los niveles de MT acetilados se hallan anormalmente disminuidos. Relacionado con su actividad deacetilasa, HDAC6 parece un factor decisivo en otros procesos como sinapsis inmune e infecciones virales (Valenzuela-Fernandez et al., 2008), así como en fenómenos de migración y motilidad celular (Tran et al., 2007; Zilberman et al., 2009).

La actividad de HDAC6 sobre otras proteínas regula también importantes funciones en la célula. **Hsp90** (*Heat shock protein 90*) fue identificada como el segundo sustrato de HDAC6 (Bali et al., 2005; Kovacs et al., 2005), pudiendo formar complejo con ella. Además, Hsp90 puede asociarse con MT (Redmond et al., 1989; Bali et al., 2005), y recientemente se ha descrito que esta asociación es dependiente de la acetilación de α -tubulina (Giustiniani et al., 2009). Curiosamente, la acetilación de Hsp90 puede ser una causa importante de la inestabilidad de algunas de sus proteínas cliente, con funciones críticas en el crecimiento y la supervivencia celular (Caron et al., 2005; Scroggins et al., 2007). La proteína **cortactina**, es otro sustrato de HDAC6 (Zhang et al., 2007b) que puede interactuar con los filamentos de F-actina para promover su polimerización y ramificación, una vez es deacetilada.

En los últimos años se han identificado, además de sustratos enzimáticos, varias proteínas de interacción con HDAC6 relacionadas con la dinámica del citoesqueleto de actina y MT. Su interacción con el adaptador de motores de kinesina y dineína, p150glued (Hubbert et al., 2002), y con motores de dineína (Kawaguchi et al., 2003), le otorgan funciones asociadas al transporte. Su conexión con proteínas de función microtubular como **tau** (Ding et al., 2008) o PP1 (*protein phosphatase 1*) (Brush et al., 2004) puede influir, al margen de su actividad deacetilasa, en la regulación de la estabilidad de MT. Otras proteínas como mDia2, un efector de RhoA, o EB1 la sitúan como nexo potencial entre filamentos de actina y la dinámica de MT (Destaing et al., 2005; Zilberman et al., 2009; Li et al., 2011a).

5.2.2 Funciones de HDAC6 dependientes de su unión a ubiquitina

El principal mecanismo de degradación de proteínas en la célula es el proteasoma o UPS (*ubiquitin proteasome system*), un complejo multiproteico proteolítico que degrada proteínas que han incorporado ubiquitina. Otra

vía importante de degradación es el agrosoma, un cuerpo de inclusión juxtanuclear cercano al MTOC en el cual proteínas mal plegadas, transportadas a través de un sistema dependiente de MT, son degradadas (Rubinsztein, 2007). En situación de sobrecarga del UPS, HDAC6 puede regular los niveles de toxicidad, actuando de conector entre proteínas poliubiquitinadas y motores de dineína en el **transporte hacia el agrosoma**. Igualmente, HDAC6 interviene en el control del reclutamiento de la maquinaria de autofagia, para la reabsorción de agregados (Iwata et al., 2005; Pandey et al., 2007; Lee et al., 2010b), pudiendo regular la actividad de Hsp90 por deacetilación de determinados residuos (Bali et al., 2005; Murphy et al., 2005; Scroggins et al., 2007). La capacidad de HDAC6 para promover la acumulación de las proteínas poliubiquitinadas es contrarrestado por la chaperona p97/VCP, que también se une a HDAC6 (Seigneurin-Berny et al., 2001). p97/VCP controla la liberación de las cadenas de poliubiquitina a las que se une HDAC6 y, por lo tanto, regula el nivel de proteínas que interaccionan con ella (Boyault et al., 2007).

Dado su papel en la eliminación de agregados proteicos, HDAC6 se presenta como una posible diana terapéutica para el tratamiento de algunas enfermedades neurodegenerativas. Se ha sugerido que HDAC6 puede ser un componente de los cuerpos de Lewy presentes en la enfermedad de Parkinson (Kawaguchi et al., 2003), así como su participación en la vía de degradación autofágica dependiente de parkina (Lee et al., 2010a). En la enfermedad de Huntington HDAC6 podría tener un papel primordial, reclutando la maquinaria de degradación autofágica hacia los cuerpos de inclusión (Iwata et al., 2005), si bien existen estudios contradictorios al respecto (Bobrowska et al., 2011).

5.3 REGULACIÓN DE HDAC6

Aunque se desconocen las vías de señalización que regulan la función de HDAC6 en neuronas, en líneas celulares se han descubierto varios candidatos que pueden regular tanto su nivel de expresión como su actividad. En células MCF-7, línea celular de cáncer de mama, la activación de receptores de estrógenos puede regular la actividad de HDAC6 en dos aspectos: incrementando sus niveles de expresión (a través de la vía genómica) (Saji et al., 2005) y/o dirigiendo su translocación a membrana, a través de una vía rápida no genómica (Azuma et al., 2009). En líneas celulares neuronales el transactivador TDP-43 (*transactive response DNA-binding protein-43*) se ha descubierto recientemente como un nuevo modulador de la expresión de HDAC6 (Fiesel et al., 2011). No obstante, según apunta la literatura más reciente, la asociación con proteínas asociadas a MT y quinasas relacionadas constituyen su fuente principal de regulación. Es el caso de TPPP/p25 (*Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25*) (Tokesi et al., 2010) y tau (Perez et al., 2009), que reducen la actividad deacetilasa de HDAC6 como resultado de su interacción. Quinasas involucradas en la organización centrosomal y la ciliogénesis, como aurora A quinasa y Nek3 (*NIMA-related kinase 3*) parecen regular la función deacetilasa de HDAC6 (Pugacheva et al., 2007; Chang et al., 2009). Por último, serina/treonina quinasas de especial relevancia en dinámica de MT, como GSK3 y CK2, han sido descritas recientemente como importantes mediadores en la activación de HDAC6 (Chen et al., 2010; Watabe and Nakaki, 2011).

6. β -CATENINA

β -catenina es una proteína de especial interés por su elevada versatilidad funcional. Su estructura le permite interaccionar con multitud de proteínas implicadas en funciones transcripcionales y estructurales. Asimismo, posee una gran variedad de modificaciones posttraduccionales que colaboran en su segregación funcional. Como proteína clave en procesos de morfogénesis celular participa activamente en procesos de polarización neuronal.

6.1 ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE β -CATENINA

β -catenina es un miembro de la familia de proteínas conocidas como “repeticiones armadillo” (inicialmente caracterizada en *Drosophila*). Posee una región central compuesta por 12 repeticiones armadillo, cada una formada por tres hélices, asociadas a su vez con las hélices del resto de repeticiones, formando una estructura tridimensional de súper hélice. Esta región es la principal de unión a varios factores: TCF (*T cell factor*), cadherina, APC y axina. Las regiones amino y carboxilo, mucho más pequeñas, son más flexibles uniendo sobre todo factores de activación transcripcional y α -catenina, que se une a través del N-terminal y la primera región armadillo para formar el complejo de adhesión (Kimelman and Xu, 2006; Gottardi and Peifer, 2008). Recientemente se ha descrito una estructura en hélice-C, incluida en la región C-terminal del dominio central, que puede considerarse como una repetición en armadillo adicional (Xing et al., 2008) (fig. I11). β -catenina puede estar presente en tres compartimientos celulares: en membrana (como componente del complejo de adhesión cadherina-catenina), en citoplasma (libre o asociada a otras proteínas como APC, axina y GSK3) y en el núcleo (donde se asocia con factores transcripcionales LEF/TCF (*T-Cell factor*, *Lymphoid-enhanced factor*)). Su versatilidad funcional está condicionada tanto por su localización subcelular como por modificaciones posttraduccionales.

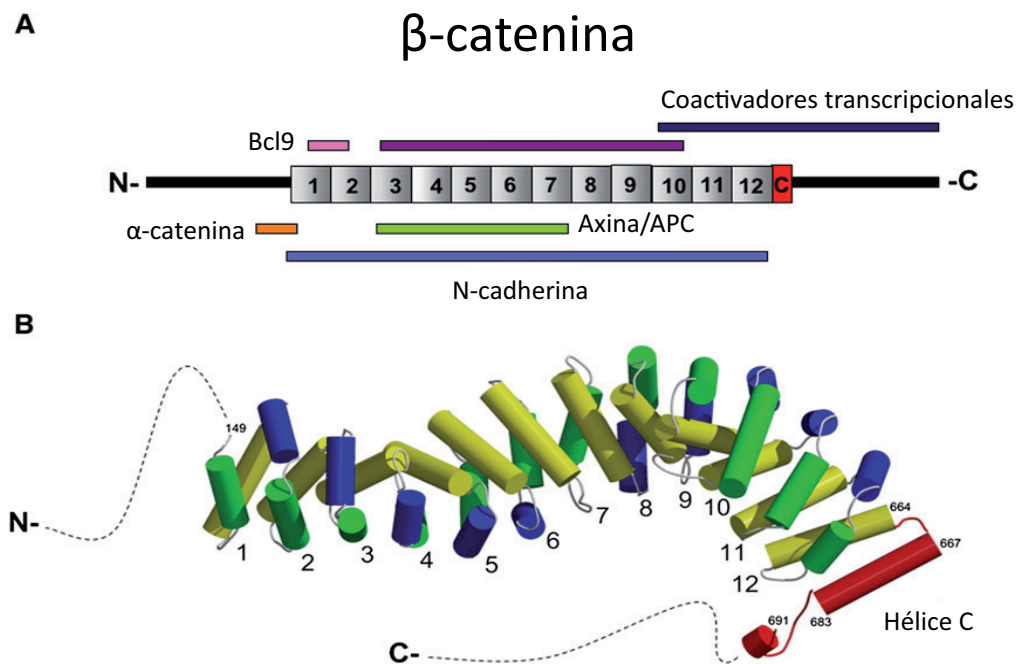


Figura I11. Estructura de β -catenina. (A) Diagrama de β -catenina con repeticiones armadillo y sus principales proteínas de unión. (B) Estructura de β -catenina revelando la hélice-C en rojo. Las regiones N y C-terminales se muestran con una línea punteada. Imagen adaptada de Gottardi and Peifer, 2008.

6.2 β -CATENINA, PROTEÍNA MULTIFUNCIONAL

β -catenina juega un papel fundamental en dos procesos celulares distintos: adhesión celular y activación transcripcional mediada por Wnt. Mayoritariamente se localiza en membrana formando un **complejo de adhesión** con cadherina y α -catenina, garantizando una correcta comunicación intercelular, funcionalidad celular e integridad tisular. El complejo de adhesión cadherina-catenina está igualmente involucrado en procesos de migración celular (Harris and Tepass, 2010). Sin embargo, su implicación en la señalización mediada por Wnt le otorga un papel de mayor trascendencia, ya que es responsable de la activación de genes implicados en desarrollo, proliferación y diferenciación celular. Por esta razón en las últimas décadas

las investigaciones se han centrado principalmente en su función como **coactivador transcripcional**, su participación en procesos tumorales está ampliamente descrito en la literatura al igual que en procesos neurodegenerativos (Moon, 2005). Esta función se regula principalmente a través de la alteración de su estabilidad. Wnt induce la estabilización del *pool* libre citoplasmático de β -catenina y promueve su translocación al núcleo, donde actúa de coactivador transcripcional de genes Tcf/LEF (Wodarz and Nusse, 1998). En ausencia de señalización de Wnt, β -catenina es rápidamente degradada por un complejo de destrucción formado por APC, axina, GSK3 y CK1 (*casein kinase 1*), donde ambas quinasas inducen su fosforilación en la región N-terminal y promueven su degradación proteasoma dependiente (**fig. 112**).

Dado que existe un solapamiento de secuencias entre elementos de las vías de señalización y adhesión, se han propuesto diferentes modelos para explicar la segregación funcional de β -catenina. Además del clásico modelo de competición, donde por ejemplo una sobreexpresión de cadherina puede antagonizar la actividad transcripcional de β -catenina, varios autores defienden un nuevo modelo basado en distintas variantes conformacionales según actúe en adhesión o transcripción (Brembeck et al., 2004; Gottardi and Gumbiner, 2004; Harris and Peifer, 2005; Ritco-Vonsovici et al., 2007).

β -catenina también puede **interaccionar con el citoesqueleto** celular a través de APC, proteína de unión de microtúbulos (Mimori-Kiyosue et al., 2000; Penman et al., 2005). El complejo APC/ β -catenina participa en la adhesión celular y en la regulación del citoesqueleto (Bienz, 2002). Otras proteínas de unión a β -catenina también son proteínas de asociación con MT. Por ejemplo, los motores de dineína interaccionan con β -catenina y pueden suponer un anclaje de MT en uniones adherentes (Ligon et al., 2001). APC y β -catenina son transportados a lo largo de los MT, asistidos por el complejo motor KAP3-KIF3A-KIF3B (Jimbo et al., 2002). De este modo, su vinculación al citoesqueleto de MT plantea un nuevo papel estructural de β -catenina, más allá de sus conocidas funciones en adhesión celular.

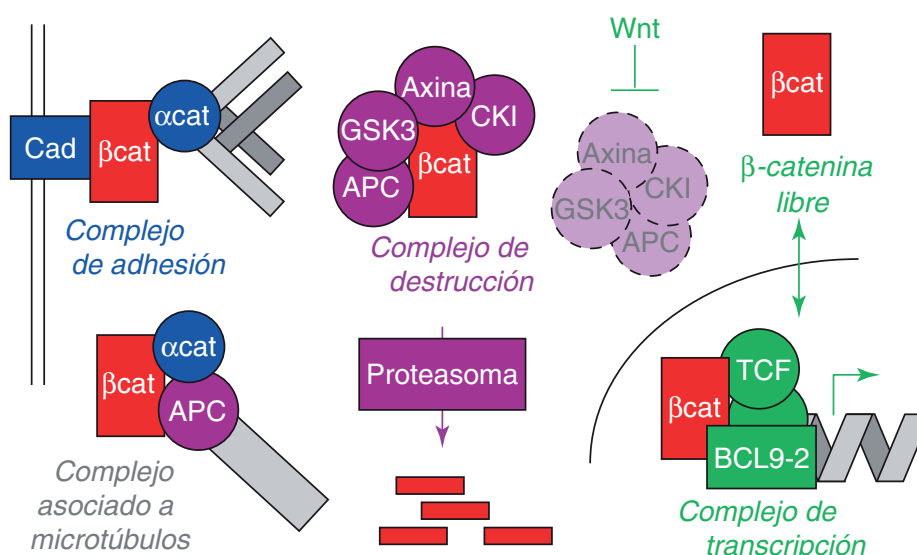


Figura 112. Localizaciones subcelulares de β -catenina. Distintos complejos proteicos en membrana, citoplasma y núcleo dirigen a la proteína en sus múltiples funciones. Imagen adaptada de Harris and Peifer, 2005.

6.3 REGULACIÓN POR FOSFORILACIÓN DE β -CATENINA

Al igual que otras proteínas, β -catenina está fuertemente regulada por una plétora de modificaciones post-traduccionales, incluyendo fosforilación (en serinas, treoninas y tirosinas), acetilación y ubiquitinación (Xu and Kimelman, 2007). En relación con su regulación por fosforilación, β -catenina es degradada siguiendo un esquema de señalización para el sistema de ubiquitinación. Determinados residuos serina y treonina situados en su extremo N-terminal son los que determinan esta señalización, concretamente serinas 33, 37 y 45 y treonina 41. En el citosol, β -catenina es regulada por el complejo de destrucción donde, tras su unión al complejo (seguramente a través de APC) es fosforilada secuencialmente primero por CK1 (en serina 45) y después por GSK3 en los residuos restantes (serinas 33, 37 y treonina 41). β -TRCP1, componente del complejo SCF ubiquitín-ligasa, reconoce esta señal y media su ubiquitinación y posterior degradación por la maquinaria del proteasoma (Hart et al., 1998; Liu et al., 2002). La unión de β -TRCP1/ β -catenina es un proceso de muy baja afinidad y es necesaria la participación de APC para potenciar su eficiencia (Wu et al., 2003; Kimelman and Xu, 2006; Su et al., 2008).

Sin embargo, la fosforilación de la secuencia N-terminal de β -catenina se ha convertido en algo más que una señal de degradación, desde que varios estudios la localizan en distintas regiones celulares. β -catenina fosforilada en los residuos GSK3 dependientes se concentra en el MTOC, y parece estar involucrada en el crecimiento de nuevos MT centrosomales (Huang et al., 2007). Durante la migración de células epiteliales se asocia con APC a la vanguardia de las zonas de avance, independientemente de N-cadherina (Faux et al., 2010), lo que sugiere un posible papel de esta fosfoproteína en la dinámica del citoesqueleto. Por otro lado la fosforilación en serina 45 de β -catenina encontrada en núcleo indica un desacoplamiento espacial, y posiblemente funcional, de la actividad quinasa de CK1 y GSK3 (Maher et al., 2010). Dado que la señalización mediada por Wnt requiere la secuencia N-terminal defosforilada de la proteína (Staal et al., 2002; Hendriksen et al., 2008) este hallazgo podría representar una función adicional de β -catenina en núcleo.

Se han descrito muchos otros puntos de regulación por quinasas en β -catenina que repercuten en sus múltiples funciones (Verheyen and Gottardi, 2010). La fosforilación de determinadas tirosinas (142 y 654) puede disminuir la presencia de β -catenina en el complejo de adhesión, e incrementar su función transcripcional (Orsulic et al., 1999; Brembeck et al., 2006). Diferentes quinasas como Akt, CK2, JNK2 (*c-Jun N-terminal kinase 2*) y PKA (*Protein Kinase A*), también incrementan su función transcripcional, mientras que otras como PKC (*Protein kinase C*) o IKK podrían regular sus niveles de degradación por proteasoma (Lamberti et al., 2001; Song et al., 2003; Hino et al., 2005; Gwak et al., 2006; Fang et al., 2007; Wu et al., 2008).

Objetivos

PROPÓSITO

El objetivo general de este trabajo experimental ha sido caracterizar los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a la formación y maduración funcional del segmento inicial del axón. A pesar de su importancia en la fisiología y excitabilidad neuronal, se desconocen los mecanismos que dirigen su arquitectura. Durante la última década, el estudio de su citoesqueleto de MT y proteínas asociadas ha cobrado cierto protagonismo. En este contexto, decidimos centrar nuestro trabajo en la caracterización del citoesqueleto de microtúbulos asociado al SIA y en el estudio de proteínas reguladoras de la dinámica de MT, durante la formación y posterior maduración funcional del SIA.

OBJETIVOS

El citoesqueleto de MT ligado al segmento inicial posee características únicas como son su disposición fasciculada o su elevado contenido en tubulina detirosinada. Por lo tanto, el análisis de proteínas que regulan modificaciones posttraduccionales de tubulina constituye un buen enfoque a la hora de estudiar las propiedades del citoesqueleto de MT asociado al SIA. En concreto, el balance de acetilación/deacetilación de tubulina, regulado por la actividad de HDAC6, es un campo desconocido en neurodesarrollo. Decidimos pues, centrar nuestro primer objetivo en el estudio de la función de HDAC6 durante el desarrollo neuronal. Por otro lado, la quinasa GSK3 interviene en la modulación del citoesqueleto de MT regulando su interacción con MAPs al igual que β -catenina, otro sustrato de GSK3, que aparece asociada a MT en estructuras de polaridad como el cono de crecimiento axonal o el centrosoma. Dada la participación de GSK3 en procesos de polaridad neuronal, decidimos centrar otro de nuestros objetivos en la implicación de GSK3 y su sustrato β -catenina en la formación y maduración del SIA.

Objetivo 1: Estudio del papel de los microtúbulos y HDAC6 durante el proceso de polaridad neuronal y el desarrollo del segmento inicial del axón

- Estudio de las propiedades de los MT en el SIA.
- Caracterización de HDAC6 durante el desarrollo neuronal *in vitro* durante los procesos de axonogénesis, elongación axonal y formación del segmento inicial del axón.

Objetivo 2: Caracterización de la función de GSK3 y β -catenina durante el desarrollo neuronal

- Caracterización de la localización de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 durante las primeras etapas del desarrollo neuronal *in vitro*.
- Estudio de la inhibición de GSK3 y la supresión de β -catenina en procesos de excitabilidad neuronal relacionados con el segmento inicial del axón.

Material y Métodos

1 CULTIVOS CELULARES

1.1 Cultivo primario de neuronas de hipocampo y corteza.

Los cultivos primarios de neuronas de hipocampo y corteza se prepararon como se ha descrito previamente (Goslin and Banker, 1989; Kaech and Banker, 2006) (**fig. M1**). En resumen, los hipocampos y cortezas se obtuvieron de embriones de ratón (cepa Swiss CD1) de 17 días y se lavaron varias veces con medio HBSS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . El tejido fue digerido con tripsina (GIBCO) al 0.25 %, en presencia de DNasa 10 mg/ml (Roche) en el caso de las cortezas, durante 15 minutos a 37°C y a continuación se disoció y resuspendió en medio de plaqueo (MEM, suero de caballo 10 % y glucosa 0.6 %). Las células disociadas se plaquearon en cubreobjetos tratados previamente con poli-L-lisina 1mg/ml (Sigma) a una densidad de 7500 células/cm². Tras 3 horas de incubación, para permitir la adhesión neuronal al sustrato, se realizó un cambio de medio a medio neuronal (NB27 (Neurobasal suplementado con B27) y Glutamax-1 (GIBCO, Invitrogen) y antibióticos). Después de 3 días de diferenciación *in vitro*, los cultivos fueron suplementados con AraC (1-β-D-arabinofuranosilcytosina, 5 μM) para prevenir la división y proliferación glial. Para realizar pruebas bioquímicas, neuronas de hipocampo o corteza fueron plaquedas en placas previamente tratadas con poly-L-lisina (0.5 mg/ml) a una densidad de 1x10⁵ células/cm².

1.2 Cocultivo de neuronas de hipocampo con astrocitos

Para el cultivo de neuronas a largo plazo (> 7 DIV) se realizaron cocultivos de neuronas sobre astrocitos, lo que permite la difusión de factores solubles sin interacción directa con astrocitos. Los cultivos primarios de astrocitos se prepararon como se ha descrito previamente (Kaech and Banker, 2006) (**fig. M1**). Las cortezas obtenidas de la disección de ratones postnatales P0-P1 se lavaron y digirieron con tripsina (GIBCO) al 0.25 %, en presencia de DNasa 10 mg/ml (Roche) durante 15 minutos a 37°C. A continuación se trituró el tejido en medio glial (MEM, suero de caballo 10 %, glucosa 0.6 %, penicilina-estreptomycin, anfotericina B y Glutamax-1), se filtró empleando un filtro de Nylon (70 μm de poro) y se centrifugó durante 10 min a 1000 rpm. Tras resuspender en medio glial, las células fueron plaquedas en *flask* a una densidad de 7.5x10⁶ células por *flask*. Después de 1 semana de incubación, se cambió el medio y tras aproximadamente 3 semanas de incubación y con repetidos cambios de medio, cuando los astrocitos llegaron a confluencia, se tripsinizaron y se plaquearon a una densidad de 10⁵ células en placas de cultivo de 60 mm de diámetro.

Las neuronas de hipocampo disociadas se plaquearon sobre cubreobjetos, a los que se habían fijado 3 ó 4 puntos equidistantes de parafina y, después de tres horas de incubación en medio de plaqueo, se colocaron los cubreobjetos de forma invertida sobre las placas de astrocitos, previamente incubados con medio neuronal durante al menos 24 horas.

1.3 Neuroblastoma N2a (CCL-131-ATCC)

Este neuroblastoma es originario de un tumor murino. Se obtuvo de la *American Type Cell Culture* (ATCC, Manassas, VA, USA) y se creció a 37°C al 7 % CO₂, en medio DMEM suplementado con suero fetal bobino 10 % (FBS, Invitrogen) y glutamina 2 mM.

1.4 Cultivo organotípico de cerebro de ratón

Rodajas de cerebro con las regiones del hipocampo y la corteza entorrinal se obtuvieron a partir de ratones postnatales de 8 días como se describe previamente (Debanne et al., 2008). Mediante el uso de un vibrátomo (Leica VT 1000S) se realizaron secciones de 300 ó 350 μm , manteniendo el tejido en una solución compuesta por sacarosa 280 mM, NaHCO_3 26 mM, KCl 1.3 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 10 mM, D-glucosa 11 mM, rojo fenol 50 mM y kinurenato 2 mM. Las secciones así obtenidas se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente en medio artificial estándar (NaCl 125 mM, KCl 2.5 mM, NaH_2PO_4 0.8 mM, NaHCO_3 26 mM, CaCl_2 3 mM, MgCl_2 2 mM, rojo fenol 50 mM y D-glucosa 11 mM) con oxígeno (95 % O_2 /5 % CO_2). Cada sección o rodaja se depositó sobre una membrana de latex (Millicel, Millipore) y después, se introdujo en una placa de Petri de 35 mm con 1 ml de medio de cultivo (MEM 25 ml, HBSS 12.5 ml, suero de caballo 12.5 ml, penicilina-estreptomicina 0.5 ml, solución de glucosa 0.8ml (1 M), solución de ácido ascórbico 0.1 ml (1 mg/ml), HEPES 0.4 ml (1 M), B27 0.5 ml y agua 8.95 ml). Las secciones se incubaron a 34°C (95 % O_2 / 5 % CO_2) durante 8-9 días. Después de 3 días *in vitro* los cultivos organotípicos fueron suplementados con AraC (5 μM).

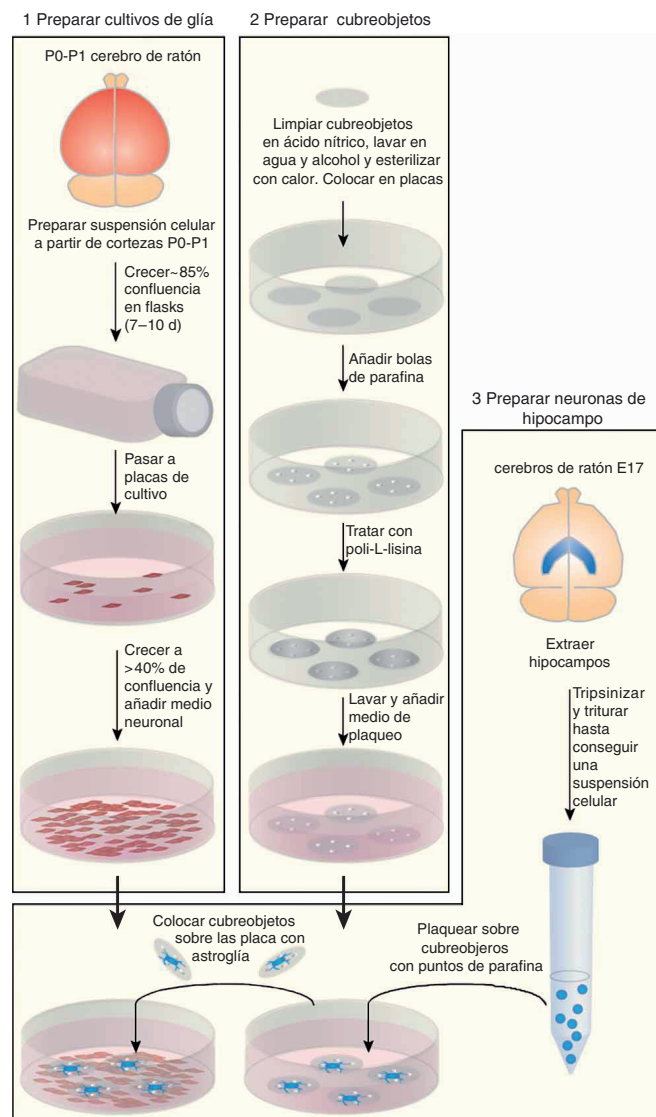


Figura M1. Esquema del proceso de elaboración de un cocultivo primario de neuronas de hipocampo sobre astrocitos. Imagen adaptada de Kaech and Banker, 2006.

2 TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS

Los compuestos farmacológicos empleados, sus características así como la concentración utilizada se detallan en la **tabla M1**. Los tiempos de tratamiento se especifican en cada experimento. Siempre que fue posible, se comprobó la efectividad del compuesto mediante inmunodetección por *Western-blot* de un control específico, o mediante verificación del fenotipo morfológico correspondiente *in vitro* y/o con un análisis inmunocitoquímico posterior.

3 PLÁSMIDOS

Los plásmidos utilizados se resumen en la **tabla M2**, y fueron amplificados en condiciones estándar (medios LB, 37°C y agitación), en la bacteria *Escherichia coli* (cepa DH5α). A partir de estos cultivos, se purificaron los plásmidos mediante el kit *HiSpeed Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN). Una vez obtenidos los plásmidos, se comprobó la naturaleza de cada plásmido mediante una digestión analítica con enzimas de restricción y comprobación en geles de agarosa con tinción de *SyBr Green* o *Gel Red*. Se cuantificó la concentración y pureza del ADN en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo scientific).

En el caso de los ARN de interferencia (shRNA) comerciales de HDAC6 y β-catenina (Origene) se confirmaron los lugares de unión a la secuencia y se realizaron transfecciones transitorias en N2a seguida de una cuantificación mediante *Western-blot* para determinar los dos clones de mayor eficacia.

4 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE N2A

La línea celular N2a se transfectó utilizando LipofectAMINE 2000 (Invitrogen) y siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. 24 horas antes de la transfección, el medio de mantenimiento se sustituyó por DMEM-0% FCS sin antibióticos. La proporción empleada de ADN/LipofectAMINE es la siguiente: 1 µg-3 µl para 5x10⁵ células. La transfección se dejó durante toda la noche y a continuación se cambió el medio por DMEM sin FBS. Se dejó un mínimo de 48 horas y 72 horas, en el caso de los plásmidos de interferencia, para garantizar la expresión de la proteína o del ARN de interferencia, respectivamente, antes de realizar los experimentos y obtener las muestras.

5 ELECTROPORACIÓN (NUCLEOFECCIÓN) DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

Para la introducción de plásmidos en neuronas de hipocampo se utilizó el sistema *Nucleofector II* (AMAXA BIOSYSTEMS), con el que se obtiene una buena eficiencia de transfección, alrededor del 15 %. Siguiendo los consejos de la casa comercial (Amaza) las células en suspensión se centrifugaron a 100 x g durante 3 minutos, y se resuspendieron en el tampón de nucleofección específico (*Mouse Neuron Nucleofector Kit*, AMAXA BIOSYSTEM). Por cada nucleofección se empleó un número de neuronas de entre 3-5x10⁶ con una cantidad total de 3 µg de ADN, en el caso de cotransfecciones con plásmido pEGFP-N1 se empleó una mezcla en proporción 1/6 (plásmido de interés/ pEGFP-N1). Después de la electroporación las células se plaquearon según el protocolo que se ha descrito previamente.

6 INTRODUCCIÓN DE PLÁSMIDOS DE EXPRESIÓN MEDIANTE *GENE GUN*

Para la introducción de plásmidos en neuronas de rodajas de cerebro se utilizó el sistema Helyos *Gene Gun* (Biorad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (**fig. M2**). Este sistema permite crear una corriente

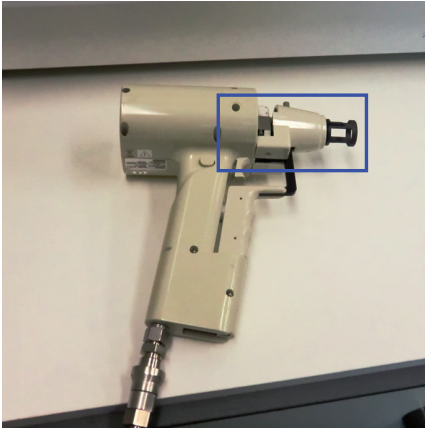
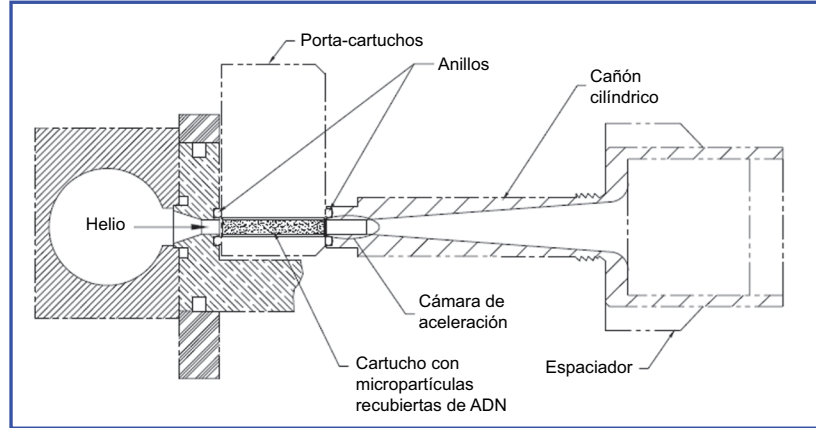
A**B**

Figura M2. Gene Gun. Imágenes ilustrativas del proceso de introducción de ADN empleando el sistema *Gene Gun* de Biorad. **(A)** *Gene Gun* de Biorad. **(B)** Esquema del reparto de partículas. El gas de helio es propulsado a través del cartucho cargado con las micropartículas recubiertas de ADN, desplazándolas de la pared interior del cartucho. Al entrar en el canal de aceleración del cañón, las micropartículas adquieren mayor velocidad para recorrer el cañón. La sección transversal del cañón cilíndrico aumenta desde la cámara de aceleración al espaciador, para moderar la onda de choque de helio y conseguir que sea menos intensa cuando alcanza las células diana. Los anillos a cada lado del soporte del cartucho dirigen el flujo de helio a través del cartucho y el canal de aceleración. El espaciador mantiene una distancia óptima con las células diana y permite la ventilación del gas de helio lejos de las mismas.

de helio de gran velocidad que consigue acelerar, hasta velocidades óptimas, partículas de oro recubiertas de plásmidos para la penetración y transformación posterior de células *in vivo* e *in vitro*. En primer lugar se prepararon cartuchos con micropartículas de oro recubiertas con el ADN plasmídico (plásmidos control e interferente de β -catenina), y tras introducirlos en un soporte especial se dispararon sobre secciones de 2 días *in vitro* a una presión de helio de 120 psi (*pounds per square inch*, libra por pulgada cuadrada). Las secciones se mantuvieron en incubación durante 7 días más, según se indica en el apartado anterior (ver sección de cultivo organotípico de cerebro de ratón).

7 EXTRACCIÓN CON DETERGENTES DE NEURONAS DE HIPOCAMPO

El análisis de estructuras de resistencia a detergentes se realizó llevando a cabo una extracción severa con Tritón X-100, modificado a partir del protocolo inicial (Winckler and Mellman, 1999). Neuronas maduras cultivadas durante 7-21 días *in vitro* se incubaron en tampón de citoesqueleto (MgCl_2 2 mM, EGTA 10 mM, Pipes 60 mM, pH 7.0) con Tritón X-100 al 0.5 % durante 5-10 minutos a 37°C (dependiendo de la edad de las células a extraer). Después de la extracción, los cubreobjetos se lavaron varias veces en tampón fosfato y se fijaron las neuronas con paraformaldehído (PFA) al 4 % en PBS.

Para la cuantificación y análisis de diferentes fracciones de tubulina se realizó una extracción de la tubulina no ensamblada, siguiendo el protocolo previamente descrito (Brown et al., 1992). Las neuronas se lavaron una vez en PBS y en tampón PHEM (PIPES 60 mM, HEPES 25 mM, EGTA 10 mM, MgCl_2 2 mM, pH 6.9) y a continuación se realizó una extracción durante 5 minutos con tampón PHEM, modificado con taxol 10 μM (Sigma), inhibidores de proteasas (COMPLETE™ Roche Diagnostics), DMSO 0.1 % (Sigma) y Tritón X-100 0.2% (Sigma). Tras la extracción, las células se lisaron y homogeneizaron en tampón de lisis (HEPES 200 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, NaF 100 mM, Na_3VO_4 1 mM, EDTA 5 mM, Tritón X-100 1%, ácido okadaico 1 μM (Calbiochem) e inhibidores de proteasas (cóctel de inhibidores de proteasas (COMPLETE™ Roche Diagnostics)). La fase soluble extraída, con tubulina no ensamblada, se diluyó en el mismo tampón.

8 INMUNOCITOQUÍMICA

Para estudiar la localización de las proteínas de interés por inmunocitoquímica fijamos las células cultivadas a una baja densidad con PFA 4 % durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBS 1X, las células fijadas se incubaron en NH_4Cl 50 nM durante 30 minutos, para eliminar la posible señal autofluorescente de las mismas. Se bloquearon uniones inespecíficas al mismo tiempo que se permeabilizó la membrana plasmática de las células durante 1 hora con tampón PGT (PBS, gelatina 0.22 % (*Gelatin from cold water fish skin*, Sigma) y Triton X-100 0.1 %). Se incubaron los anticuerpos primarios (**tabla M3**) diluidos en PGT durante 1 hora a temperatura ambiente y, tras lavados en flujo continuo con la misma solución de bloqueo, se incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa fluor-488 (emisión en verde), 555-594 (emisión en rojo) o 647 (emisión en rojo lejano y posterior conversión a azul) (1/1000, Invitrogen). Para ver la disposición de F-actina polimerizada se utilizó Faloidina acoplada a Alexa 594 (1/100, Invitrogen). Para la tinción de núcleos se empleó TO-PRO-3 iodide (642/661) (1/1000 Invitrogen). Los cubreobjetos se montaron sobre Fluoromount G (Southern Biotechnology Associates, Inc.) al finalizar las incubaciones y los lavados del anticuerpo secundario.

Las imágenes de confocal se obtuvieron utilizando un microscopio de barrido confocal LSM 510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) realizando un *stack* (número de planos focales por conjunto de planos) de número variable dependiendo del tamaño celular. Las imágenes adquiridas con óptica de Nomarski (óptica de contraste interdifereencial ó DIC (*Differential interference contrast*)) fueron adquiridas en el mismo equipo empleando prismas de Wollaston. Finalmente todas las imágenes fueron procesadas con el software Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, San José, California, EEUU).

Los parámetros de longitudes de axón y dendritas se midieron con la aplicación Neuron J (Image J) así como la intensidad de fluorescencia en axones y segmentos iniciales (Image J). Se llevaron a cabo tres réplicas de cada experimento y tras contabilizar un mínimo de 100 células por condición experimental de cada experimento, se analizó su grado de significación estadística mediante el test t de Student (programa SigmaPlot.11).

9 INMUNOHISTOQUÍMICA

Cerebros de ratones de diferentes edades de desarrollo se fijaron por inmersión durante una noche a 4°C en PFA al 4 % pH 7.4 preparado en PBS. Al día siguiente se inició el proceso de crioprotección pasando los cerebros a sacarosa al 30 %. Se dejaron en esta solución hasta que la sacarosa difundió hacia el interior del órgano, observando una pérdida de flotabilidad. Por último, se congelaron los órganos en OCT (*Optimum Cutting Temperature*; Leica Microsystems GmbH) y se almacenaron a -70°C hasta el momento del corte. La tinción inmunohistoquímica se realizó según el método de cortes flotantes. Empleando un criostato CM1900 (Leica Microsystems GMBH) se realizaron secciones coronales de 30 μm y se depositaron en PBS. Los cortes se permeabilizaron durante 1 hora en solución de bloqueo (PBS, suero de caballo 10 % (*Horse Serum*, Invitrogen) y Tritón X-100 0.5 %). Se incubaron los anticuerpos primarios durante 24 horas a temperatura ambiente y, tras sucesivos lavados con solución de bloqueo, se incubaron los correspondientes anticuerpos secundarios Alexa fluor-488 (emisión en verde) y 555 ó 594 (emisión en rojo). Para la tinción de los núcleos se empleó TO-PRO-3 iodide (642/661) (1/1000 Invitrogen). Después de sucesivos lavados se colocaron sobre portaobjetos (*SuperFrost Plus*, VWR International) y se montaron sobre Fluoromont-G.

En el caso de las secciones que habían sido utilizadas para registros electrofisiológicos, la tinción inmunohistoquímica de secciones cerebrales se llevó a cabo según el protocolo descrito, previa fijación durante 1 hora en PFA al 4 %. Se incrementaron los tiempos de incubación en solución de bloqueo (PBS, suero de cabra 10 % (*Goat Serum*, Invitrogen) y Tritón X-100 2 %) a 3 horas y se emplearon los anticuerpos secundarios Alexa fluor-488 (emisión en verde), 555 ó 594 (emisión en rojo) y Alexa fluor-647 (emisión en rojo lejano y posterior conversión en azul) (1/1000, Invitrogen). Para la tinción de núcleos se empleó DAPI (1/1000 Calbiochem).

10 TINCIÓN GIEMSA

La tinción de Giemsa se realizó en algunas secciones coronales de 10 μ m incubando en solución comercial de Giemsa (Merk) durante un 1 minuto a temperatura ambiente. A continuación los cortes se diferenciaron con alcohol de 96° durante un minuto y se deshidrataron con alcohol de 100° durante otro minuto. Por último, se aclararon las muestras con xilol (Merck) y se montaron con medio de montaje Entellan New (Electron Microscopy Sciences). Las imágenes se adquirieron con un microscopio óptico Olympus BX41.

11 ANALISIS DE PROTEINAS POR ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNODETECCIÓN (*WESTERN-BLOT*)

Las células se lisaron en hielo durante 30 minutos con tampón de lisis (HEPES 200 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, NaF 100 mM, Na_3VO_4 1 mM, EDTA 5 mM, Triton X-100 1 %, ácido okadaico 1 μ M (Calbiochem) e inhibidores de proteasas (Cóctel de inhibidores de proteasas (COMPLETE™ Roche Diagnostics)), se añadió tampón de carga Laemli (concentración final Tris HCl 125 mM, SDS 4 %, Glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0.002 % (Laemmli, 1970)) y se hirvieron a 100°C durante 10 minutos. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis. Se llevó a cabo una electroforesis en gel de acrilamida/SDS (de entre un 8 y un 12 % de acrilamida) para separar las proteínas en función de su peso molecular en tampón de electroforesis: tampón Tris 25 mM, glicina 192 mM, 0.1 % SDS, pH 8.3 (Towbin et al., 1979) y un voltaje de 200 V. A continuación, se transfirieron las proteínas a un soporte de nitrocelulosa (PROTRAN) en un tampón Tris 25 mM, metanol 20 % y 0.1 % SDS durante 145 minutos a 350 mA. Tanto para la electroforesis de proteínas como para la transferencia se utilizó el sistema MiniPROTEAN (BIORAD). Las membranas de nitrocelulosa se mantuvieron en agitación en PBT-Tween20 0.1 % (PBT) 5 % leche desnatada durante 1 hora para bloquear las uniones inespecíficas y se incubaron con los anticuerpos primarios (**tabla M3**) durante una noche a 4°C o durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente a una dilución de 1/5000 o 1/10000, (Amersham, GE Healthcare). Para la inmunodetección posterior se empleó un sistema de quimioluminiscencia (*Enhanced Chemiluminescence detection system ECL*, Amersham) por exposición y revelado de películas de autorradiografía KODAC o Amersham. La cuantificación de la densidad óptica se llevó a cabo en un densitómetro modelo GS-710 (Biorad, Life Science Research, CA, USA) con el software "Quantity one".

En los casos que fue necesario, se eliminaron los anticuerpos del soporte de nitrocelulosa por incubación durante 2 horas en un tampón de *stripping* (glicina 0.75 % pH 2.2, SDS 1 %, NP40 0.5 %). Los datos obtenidos procedentes de al menos tres ensayos independientes se representaron haciendo la relación de la señal cuantificada en relación a la obtenida con un anticuerpo del control de carga total de proteína, y se analizó su grado de significación estadística mediante un *t-test* (programa SigmaPlot.11).

12 ELECTROFISIOLOGÍA

Los registros intracelulares de célula completa se obtuvieron de neuronas hipocampales de CA3 o neuronas piramidales corticales (capa V). La solución de registro externa (extracelular) contenía: NaCl 125 mM, NaHCO₃ 26 mM, CaCl₂ 3 mM, KCL 2.5 mM, MgCl₂ 2.5 mM, NaH₂PO₄ 0.8 mM y D-glucosa 10 mM, y fue equilibrado con 95 % O₂-CO₂. Se emplearon electrodos de plata clorurada incluidos en micropipetas de vidrio afilado rellenas con la solución intracelular: gluconato potásico 120 mM, KCl 20 mM, EGTA 0.5 mM, HEPES 10 mM, Na₂ATP 2 mM, NaGTP 0.3 mM y MgCl₂ 2 mM, pH 7.4. Los registros se llevaron a cabo a 29°C. Las señales de estimulación y las respuestas de las células se registraron, respectivamente, empleando el programa de ordenador "Clampex", incluido dentro del conjunto de programas pClamp (versión 8 o 10, Axon Instrument). Los registros fueron filtrados contra el paso de bajas frecuencias (3 kHz) y la adquisición de secuencias (500-1500 ms) se realizó a una frecuencia de 0.1 Hz. Las corrientes de sodio fueron evocadas por un pulso de voltaje (50 ms) de -80 mV a -20 mV en *voltage-clamp*. Los componentes capacitivo y de pérdida de la corriente evocada fueron sustraídos con un protocolo convencional P/4. La excitabilidad neuronal intrínseca fue monitoreada con pulsos de corriente de despolarización (1 segundo) de amplitud creciente (de +10/+500 pA) (*current-clamp*).

Compuesto	Sustrato	Efecto	Uso	Origen
Cadmio	Canales de calcio dependientes de voltaje	Bloqueo no selectivo de canales de calcio dependientes de voltaje	50 µM	Sigma #655198
Cytochalasin D	Filamentos de actina	Inhibidor de polimerización de actina	5 µM	Sigma #C8273
GSK3 inhibitor X	GSK-3α/β	Inhibición ATP-competitiva	3 µM	Calbiochem #361551
GSK-3β inhibitor VIII, AR-A014418	GSK-3β	Inhibición ATP-competitiva	20 µM	Calbiochem #361549
Lithium chloride (LiCl)	IMPasa, GSK3	Inhibición no-competitiva	2.5 mM 5 mM	Sigma #L9650
MG-132	Proteasoma	Inhibición reversible	25 nM 50 nM	Calbiochem #474790
Niltubacin	Análogo carboxilato de tubacin	Control negativo de tubacin	10 µM 20 µM	Cedido por Ralph Mazitschek
Nocodazole	β-tubulina	Inhibición de la dinámica de MT	10 nM 50 nM	Sigma #M1404
Paclitaxel (taxol)	N-terminal de β-tubulina	Estabilizador de MT	10 nM 50 nM	Sigma #T7402
Phospho-β-catenin (Ser33/37/Thr41) Blocking Peptide	Phospho-β-catenin (Ser33/37/Thr41)	Péptido bloqueante	1/200	Cell Signaling #1120
Trichostatin A (TSA)	Histona-deacetilasas	Inhibición reversible	100 nM 200 nM	Sigma #T1952
Tubacin	HDAC6	Inhibición reversible	10 µM 20 µM	Cedido por Ralph Mazitschek
XE999	Canales de potasio KCNQ dependientes de voltaje.	Bloqueo selectivo de canales KCNQ.	10 µM	Tocris #2000

Tabla M1. Tratamientos farmacológicos

Plásmido (vector backbone)	Contenido	Procedencia
pEGFP-N1	Proteína GFP ("enhanced")	Clontech
HDAC6-Flag (pcDNA3.1)	HDAC6-Flag en N-terminal	Addgene plasmid 13823
HDAC6-GFP (pEGFP-N1)	HDAC6-GFP	Cedido por Dr. Sánchez Madrid (Cabrero et al., 2006)
HDAC6-H216A/611A-GFP (pEGFPN1)	HDAC6 H216A/611A -GFP (forma no activa)	Cedido por Dr. Sánchez Madrid (Cabrero et al., 2006)
HDAC6-GFP-ΔRV (pEGFP-N1)	HDAC6-GFP en N-terminal (delección de la región UBD)	Cedido por Dr Yao (Brush et al., 2004)
Scramble shRNA pGFP-V-RS	Secuencia control <i>scramble</i> para interferentes	Origene TR30007
HDAC6 shRNA pGFP-V-RS	shRNAs de HDAC6	Origene GI571734 GI571737
Ank3 shRNA pGFP-V-RS	shRNA de Ankirina G	Origene GI530775
Scramble shRNA pRFP-C-RS	Secuencia control <i>scramble</i> para interferentes	Origene TR30015
β-catenin shRNA pRFP-C-RS	shRNAs de β-catenin	Origene FI354649 FI354650

Tabla M2. Plásmidos empleados

Anticuerpo	Clase	Pm (KDa)	Dilución	Procedencia	Referencia
Acetylated tubulin Clone 6-11B-1	Monoclonal Ratón	50	WB:1/5000 IC: 1/2000	Sigma	T6793
Alpha-tubulin	Monoclonal Ratón	50	WB:1/5000 IC: 1/2000	Sigma	T6199
Alpha-tubulin	Policlonal Conejo	50	IC: 1/1000	Cedido por Dr. Arévalo	
Ankyrin-G	Monoclonal Ratón	200 300	IC: 1/100	Zymed Laboratories	33-8800
Ankyrin-G Clone N106/36	Monoclonal Ratón	270	IC: 1/100 IH: 1/200	Neuromab	75-146
APC (C-TERMINAL)	Monoclonal Ratón	310	IC: 1/150	Millipore	MAB3786
β-actin	Monoclonal Ratón	42	WB:1/1000	Sigma	A2228
β-catenin	Monoclonal Ratón	90	WB: 1/800 IC/ 1/500	BD Transduction Laboratories	610154
Detyrosinated tubulin (Glu-tubulin)	Policlonal Conejo	50	WB:1/2000 IC: 1/1000	Millipore	AB3201
EB1	Monoclonal Ratón	30	WB:1/1000 IC/ 1/100	BD Transduction Laboratories	610534

Flag (reconoce proteínas de fusión a flag , N-terminal)	Policlonal Conejo	-	WB: 1/100 IC: 1/1000	Sigma	F7425
GAPDH	Monoclonal Conejo	37	WB:1/1000	Cell Signaling	2118
GFP from mouse IgG ₁ κ (clones 7.1 and 13.1)	Monoclonal Ratón	27	WB: 1/100 IC: 1/1000	Roche	11814460001
GFP Rabbit serum	Policlonal Conejo	27-30	IC: 1/1000	Invitrogen	A-6455
GSK3α/β	Monoclonal Ratón	46, 51	IC: 1/800	Invitrogen	44-610
γ-tubulin	Monoclonal Ratón	48	IC: 1/100	Sigma	T6557
HDAC6 (H-300)	Policlonal Conejo (región C-terminal)	134	WB: 1/200	Santa Cruz Biotechnology	sc -11420
HDAC6 ChIP Grade	Policlonal Conejo (región N-terminal)	134	IC: 1/250 WB: 1/200	Abcam	Ab47181
HDAC6, CT	Policlonal Conejo (región C-terminal)	134	WB: 1/500 IC: 1/500	Upstate	07-732
14D4 (marcador de SIA) (Buffington et al., 2012)	Policlonal Conejo	36	WB: 1/500 IC: 1/250	Cell Signaling	2859
Kinesin 5C	Policlonal Conejo	110	IC: 1/400	Abcam	ab5630
MAP2	Policlonal Conejo	280/70	IC: 1/1000	Millipore	AB5622
MAP2	Policlonal Pollo	280/70	IC:1/10000	Abcam	ab5392
N-Cadherin	Monoclonal Ratón	130	IC: 1/500	BD Transduction Laboratories	610920
Neural class III β-tubulin (TUJ-1)	Monoclonal Conejo	50	IC: 1/1000	Covance	MRB-435P
Phospho-β-catenin (Ser33/37)	Policlonal Conejo	90	WB: 1/500 IC: 1/200	Cell Signaling	2009
Phospho-β-catenin (Ser33/37/Thr41)	Policlonal Conejo	90	WB: 1/500 IC: 1/200 IH: 1/50	Cell Signaling	9561
Sodium Channel (Pan) Clone K58/35	Monoclonal Ratón	260 /33	IC: 1/50 WB: 1/200	Sigma	S8809
Tau-1, clone PC1C6	Monoclonal Ratón	52-68	IC: 1/1000	Millipore	MAB3420
Tyrosine tubulin Clone TUB- 1A2	Monoclonal Ratón	50	WB: 1/5000 IC: 1/2000	Sigma	T9028

Tabla M3. Anticuerpos utilizados. WB: *Western Blot*; IC: Inmunocitoquímica; IH: Inmunohistoquímica

Resultados

ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS MICROTÚBULOS Y HDAC6 DURANTE EL PROCESO DE POLARIDAD NEURONAL Y EL DESARROLLO DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

1 COMPOSICIÓN DEL CITOESQUELETO DE MICROTÚBULOS EN EL AXÓN Y EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Debido a la implicación del citoesqueleto de MT en procesos de formación, elongación y maduración funcional, decidimos iniciar nuestro estudio analizando la distribución de PTM a lo largo del axón y, especialmente, en el segmento inicial del axón. En primer lugar analizamos la distribución de PTM en neuronas de hipocampo de 3 DIV, realizando tinciones inmunocitoquímicas con marcadores de tubulina tirosinada (Tyr-T), tubulina detirosinada (DeTyr-T) y α -tubulina acetilada (Ac- α -T). De acuerdo con la literatura, observamos que la tubulina tirosinada se localizaba mayoritariamente en las zonas más distales del axón y el cono de crecimiento, mientras que Ac- α -T y DeTyr-T se concentraba en las zonas centrales y más proximales del axón, previas al cono de crecimiento axonal (**fig. R1 A**). A continuación, evaluamos la presencia de estas modificaciones de tubulina en el SIA, empleando neuronas de 7 DIV más desarrolladas. Para realizar este análisis utilizamos una técnica de extracción a partir del protocolo establecido por la Dr. Winckler y colaboradores (Winckler et al., 1999) (ver sección material y métodos). Empleando una concentración moderada del detergente no iónico Tritón X-100 a una temperatura de 37°, conseguimos disgregar la membrana plasmática y el citoesqueleto celular. Debido a la fuerte cohesión entre proteínas y lípidos de membrana la estructura del SIA persiste, aún después de la extracción y nos ofrece la posibilidad de detectar nuevas proteínas asociadas al segmento inicial. Así pues, una vez extraídas con Tritón X-100 durante 5 minutos, las neuronas se fijaron y tiñeron con marcadores del SIA (canales de sodio y 14D4) y con anticuerpos que reconocen Tyr-T, DeTyr-T y Ac- α -T. Neuronas controles no sometidas a extracción se tiñeron adicionalmente con el marcador somatodendrítico MAP2 (**fig. R1 B**). Como se puede apreciar en la figura R1 B, las neuronas fijadas a 7 DIV revelan una distribución homogénea

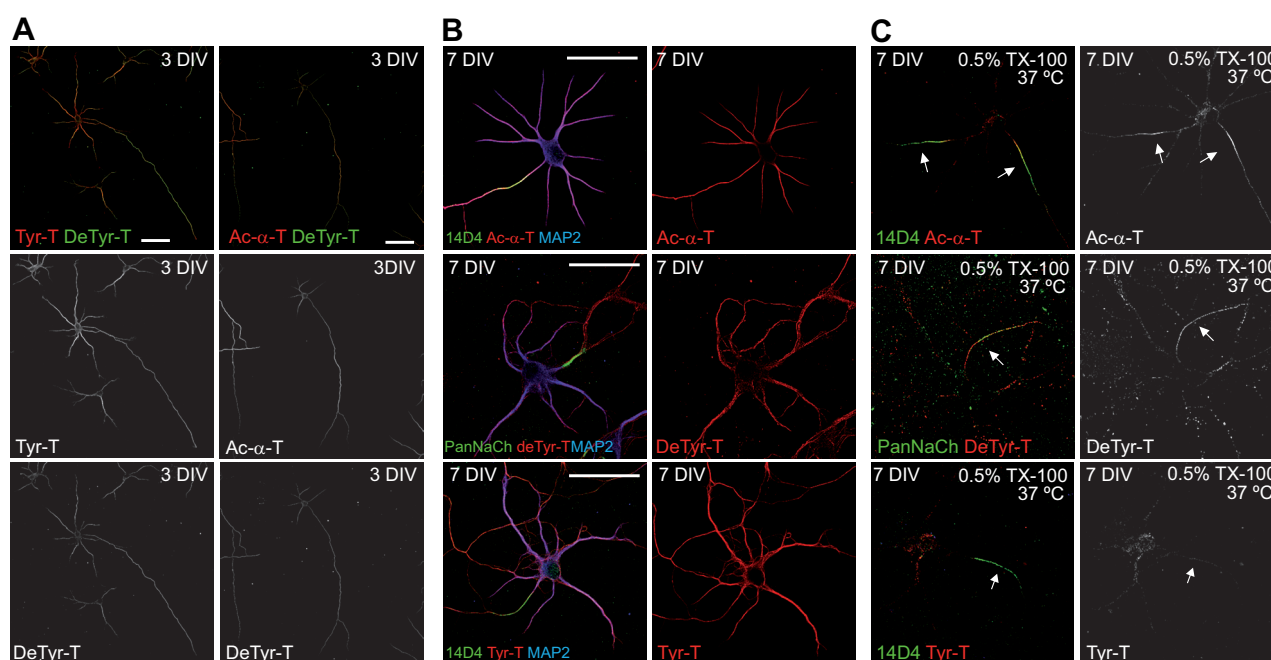


Figura R1. Los microtúbulos del SIA son resistentes a la extracción con detergentes y están detirosinados y acetilados. (A) Neuronas de hipocampo de 3 DIV fijadas y teñidas con marcadores de modificaciones posttraduccionales de tubulina: tubulina tirosinada (Tyr-T), tubulina detirosinada (DeTyr-T) y acetilada (Ac- α -T). (B) Neuronas de 7 DIV se fijaron y tiñeron con marcadores del segmento inicial 14D4 y PanNaCh (verde); con marcadores de tubulina tirosinada (Tyr-T), detirosinada (DeTyr-T) y acetilada (Ac- α -T) (rojo) y con MAP2 (azul). (C) Parte de las neuronas descritas en B se fijaron y tiñeron después de realizar una extracción con Tritón X-100 0.5% durante 5 minutos a 37°C. Las flechas indican la posición de los segmentos iniciales. Barra de escala = 50 μ m.

de todas las tubulinas en dendritas y axón. Sin embargo, la extracción previa con Tritón 0.5% desvela una concentración específica en SIA de tubulina detirosinada y acetilada, colocalizando con marcadores de segmento inicial (**fig. R1 C**). Por el contrario, la tubulina tirosinada (Tyr-T) desaparece de la mayoría de neuronas o no se concentra a los mismos niveles que su análoga detirosinada. Por lo tanto, podemos afirmar que los microtúbulos del citoesqueleto asociado al SIA están acetilados y detirosinados y comparten las mismas propiedades que otras proteínas del SIA.

2 EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN DE HDAC6 DURANTE EL DESARROLLO NEURONAL *IN VITRO*

La acetilación es una modificación de tubulina que se encuentra en MT estables de larga vida media y forma parte de una estructura de elevada cohesión como es el SIA. Dado que además suscita un interés creciente en fenómenos de neurodesarrollo, nos centramos en el estudio de HDAC6, una de las enzimas que regulan la deacetilación de α -tubulina. La presencia de HDAC6 en cerebro se ha confirmado por medio de diversos estudios (Southwood et al., 2007; Perez et al., 2009). Sin embargo, se desconoce su localización subcelular a lo largo del desarrollo neuronal. Por esta razón, decidimos iniciar nuestro estudio en la localización de HDAC6 durante los primeros estadios de desarrollo neuronal, en cultivos de neuronas de hipocampo.

2.1 HDAC6 limita su expresión a los territorios de tubulina acetilada y colocaliza con tau-1 en el axón durante las primeras etapas de diferenciación *in vitro*.

En primer lugar analizamos la expresión de HDAC6 en nuestro modelo de estudio mediante anticuerpos específicos de HDAC6 (ver sección material y métodos). Previamente a los experimentos de inmunocitoquímica, evaluamos la especificidad de nuestros anticuerpos. El anticuerpo anti-HDAC6 (abcam) fue analizado mediante un ensayo de *Western-blot*, con extractos totales de neuronas de hipocampo en cultivo, y extractos de células N2a transfectadas con la proteína de fusión humana HDAC6-flag. Como se muestra en la figura R2 A, este anticuerpo de HDAC6 reconoce tanto la proteína humana como la de ratón. En experimentos adicionales también comprobamos otro anticuerpo (casa comercial Upstate) realizando ensayos de *Western-blot* e

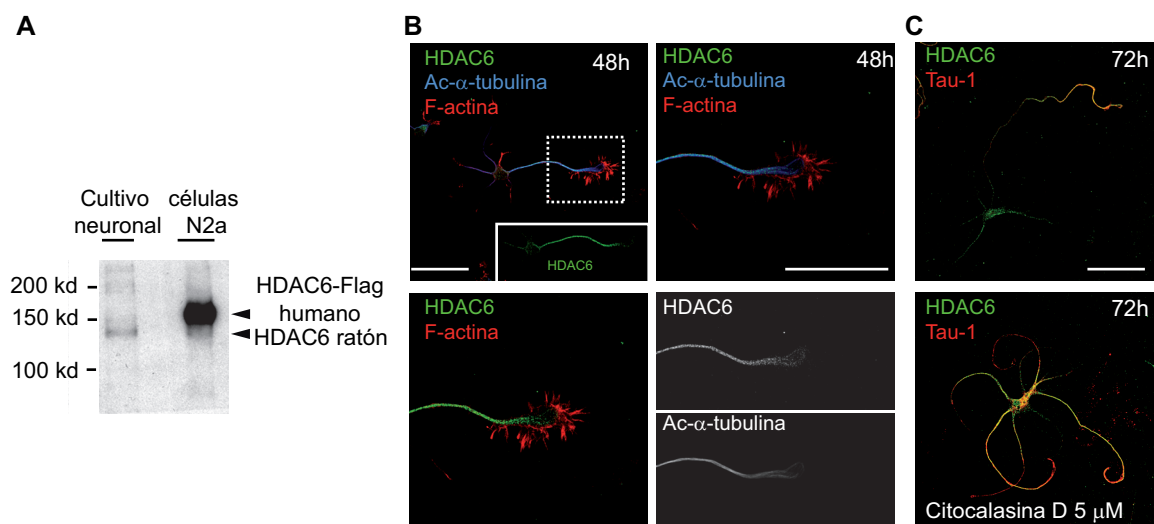
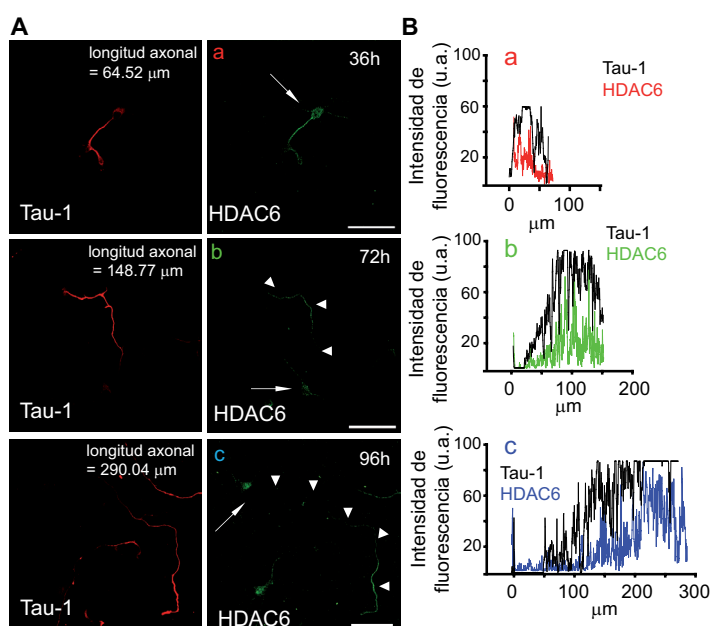


Figura R2. Distribución de HDAC6 en neuronas de hipocampo. (A) Expresión de HDAC6 en extractos de neuronas de hipocampo de 3 DIV y células de neuroblastoma N2a transfectadas con el plásmido HDAC6-Flag (proteína humana). (B) Neuronas de hipocampo de 2 DIV se incubaron con el mismo anticuerpo que reconoce HDAC6 descrito en A, con un anticuerpo dirigido contra α -tubulina acetilada (Ac- α -tubulina) y con faloidina-594 para poner de manifiesto F-actina. La zona recuadrada se corresponde con las imágenes en detalle del tramo final del axón y el cono de crecimiento. (C) Neuronas de hipocampo de 3 DIV con fenotipo monoaxonal (panel superior) y multiaxonal (panel inferior, tratamiento con citocalasina D) teñidas frente a HDAC6 y tau-1. Barra de escala= 50 μ m.

inmunocitoquímica similares. A continuación analizamos la expresión de HDAC6 en neuronas de hipocampo de 2 DIV. Como se muestra en la figura R2 B, aunque HDAC6 aparece homogéneamente distribuida por toda la célula (neuritas, soma y axón) está claramente concentrada en axón ocupando los mismos territorios que α -tubulina acetilada, su sustrato putativo. En el cono de crecimiento axonal no parece interactuar con territorios periféricos de F-actina, quedando restringida su localización a las zonas de MT. Confirmamos seguidamente que su localización era axonal empleando un anticuerpo que reconoce una forma defosforilada de tau, tau-1, en el axón de neuronas de 3 días y, además, en todos los axones del fenotipo multiaxonal generado por el tratamiento con citocalasina D (**fig. R2 C**). Curiosamente observamos un patrón axonal de concentración creciente de HDAC6 hacia el cono de crecimiento que concuerda con la presencia de tau-1. Este patrón se adquiere durante el proceso de elongación axonal (**fig. R3**) de modo que, en axones incipientes (neuronas de 1.5 días) HDAC6 se concentra en zonas proximales, mientras que en estadios tardíos, de 3 a 4 días de desarrollo, se concentra en las zonas más distales del axón en crecimiento.



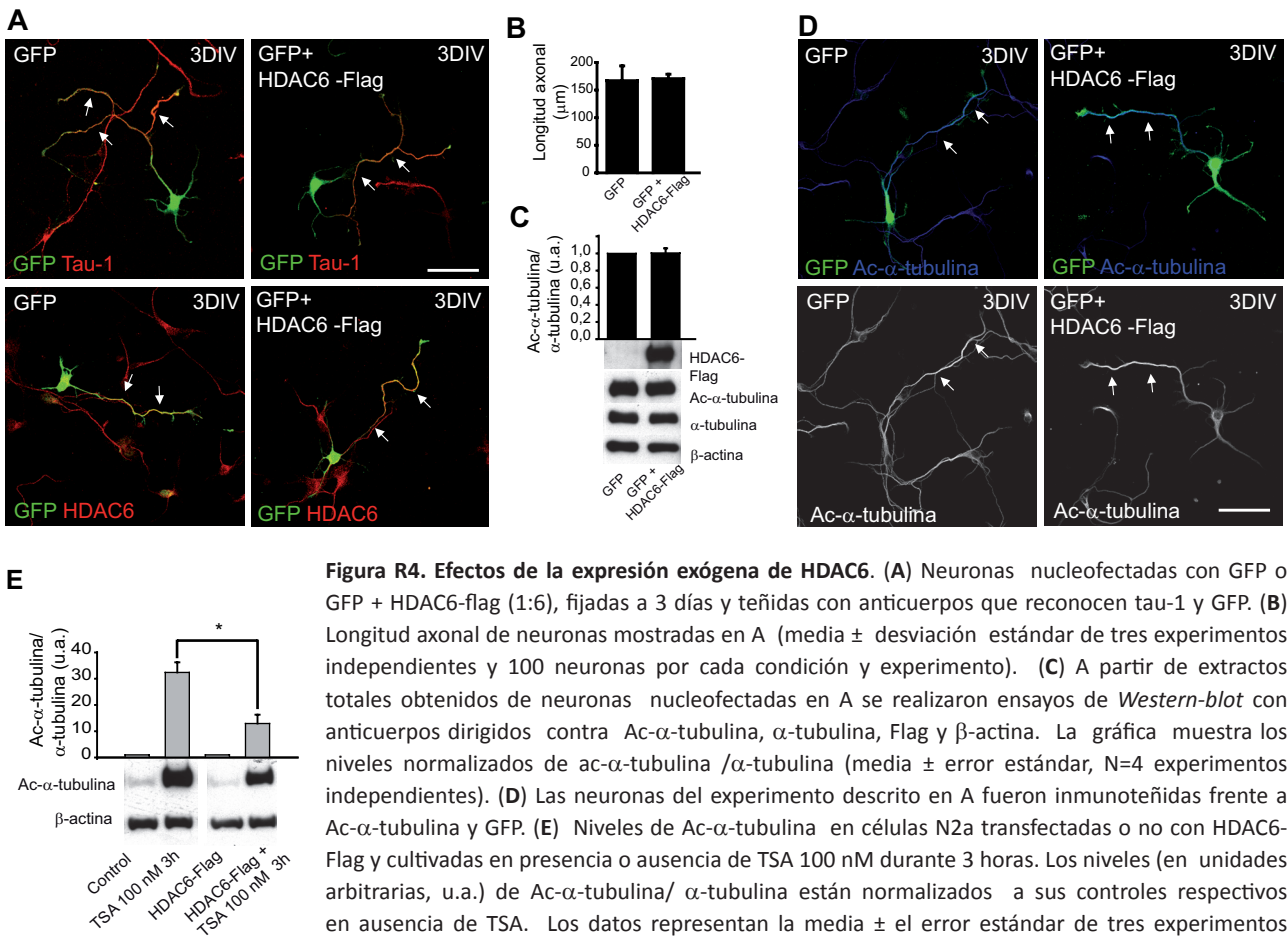
3 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE HDAC6 EN AXONOGÉNESIS Y ELONGACIÓN AXONAL

Una vez confirmada la localización preferentemente axonal de HDAC6, nuestro siguiente objetivo fue analizar su implicación funcional en dos procesos de especial relevancia en el establecimiento de la polaridad neuronal: axonogénesis y elongación axonal. Para ello, realizamos ensayos de pérdida o ganancia de función evaluando los niveles del sustrato α -tubulina acetilada, y analizamos los cambios en la morfología axonal.

3.1 Efectos de la expresión exógena de HDAC6

En una primera aproximación decidimos estudiar el efecto de la expresión exógena de HDAC6, nucleofectando plásmidos que expresan la proteína de fusión HDAC6-flag. Realizamos cotransfecciones con un plásmido que expresa GFP en proporción 1:6 (GFP:HDAC6-flag). Transcurridos 3 días de diferenciación *in vitro* fijamos las neuronas nucleofectadas. A continuación, analizamos la morfología axonal y evaluamos la función deacetilasa de HDAC6 realizando tinciones inmunocitoquímicas con un anticuerpo anti- α -tubulina acetilada y un anticuerpo anti-tau-1 para identificar el axón. En paralelo, analizamos los niveles de expresión de HDAC6 y α -tubulina acetilada mediante ensayos de *Western-blot* (**fig. R4**). La expresión exógena de HDAC6 no alteró la morfología axonal ni su longitud ($170.67 \pm 8.01 \mu$ m vs $167 \pm 26.76 \mu$ m en neuronas control) (**fig. R4 A y B**).

Curiosamente no hallamos diferencias significativas en los niveles de α -tubulina acetilada (**fig. R4 C y D**), lo cual nos llevó a plantear un experimento adicional para confirmar la actividad deacetilasa de nuestra proteína de fusión. El compuesto TSA es un inhibidor general de HDAC de tipo I y II que induce un notable incremento en los niveles de α -tubulina acetilada (Yoshida et al., 1990; Hubbert et al., 2002). Así pues, empleando este inhibidor en células N2a, previamente transfectadas con HDAC6-flag, encontramos una reducción significativa en los niveles de α -tubulina acetilada (**fig. R4 E**). Si bien este experimento confirma la idoneidad del plásmido de expresión, cabe destacar que los niveles basales de Ac- α -tubulina observados en neuronas de hipocampo primarias son cuantitativamente superiores a los encontrados en células de neuroblastoma N2a (**fig. R4 C y E**). Por lo tanto, una posible hipótesis para explicar la ausencia de efecto de la sobreexpresión de HDAC6 podría ser que, dado los elevados niveles de Ac- α -tubulina en condiciones normales, la actividad de HDAC6 se halle fuertemente regulada.



3.2 La inhibición y supresión de HDAC6 disminuyen la elongación axonal

En una primera aproximación nos propusimos examinar el efecto de la inhibición de HDAC6 mediante el empleo del compuesto TSA. Previamente realizamos contajes celulares para determinar las concentraciones idóneas, a las cuales la inhibición crónica no afectara a la viabilidad celular. A continuación establecimos dos periodos distintos de inhibición para abarcar el proceso de axonogénesis (las primeras 48 horas *in vitro*) y el proceso de elongación axonal posterior (desde 48 a 96 horas *in vitro*). Como se muestra en la figura R5 la inhibición con TSA afecta tanto a la formación del axón como a su elongación (**fig. R5 A**). Sólo el 43.44 ± 8.25 % ó 29.28 ± 5.12 % de las neuronas tratadas durante las primeras 48 horas con TSA 100 nM y 200 nM, respectivamente, fueron capaces de desarrollar un axón, a diferencia de las neuronas control ($78.37 \pm$

3.62%) (**fig. R5 B**). La inhibición posterior a 2 DIV produjo una reducción de la longitud axonal igualmente significativa. Mientras que neuronas control de 4 DIV desarrollaron axones de una longitud media de $310.57 \pm 19.09 \mu\text{m}$, el tratamiento con TSA 100 nM y 200 nM resultó en una reducción media axonal de $151.86 \pm 22.86 \mu\text{m}$ y $126 \pm 0.41 \mu\text{m}$ respectivamente (**fig. R5 C**). Antes de evaluar los niveles totales de α -tubulina acetilada realizamos una extracción previa con tampón PHEM (ver sección material y métodos), para eliminar MT no ensamblados. Como se aprecia en la figura 4R D, el tratamiento con TSA incrementa los niveles de acetilación de la fase soluble y la fase ensamblada, aunque cuantitativamente el efecto es mayor en la fase soluble. Este dato confirma que la deacetilación de α -tubulina ocurre mayoritariamente en la fracción soluble recién despolimerizada y más dinámica de los MT (Black et al., 1989).

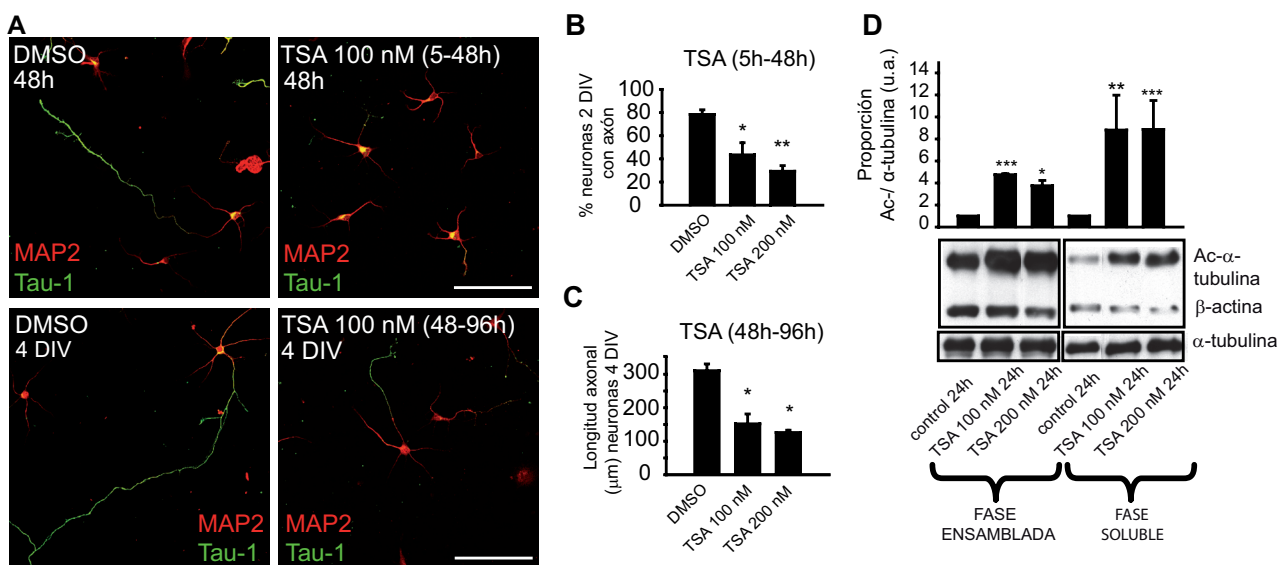


Figura R5. La inhibición de HDACs afecta a la formación y a la elongación axonal. (A) Neuronas de hipocampo de 2 DIV cultivadas durante 48 horas en presencia o ausencia de TSA (100 nM), y neuronas de 4 DIV tratadas con TSA de 48 a 96 horas. Tras su fijación fueron teñidas con anticuerpos dirigidos contra MAP2 y tau-1 para visualizar los compartimentos somatodendrítico y axonal, respectivamente. Barra de escala= 50 μm . (B) Porcentaje de neuronas de 2 DIV tratadas con DMSO, TSA 100 nM y TSA 200 nM de 5 a 48 horas que desarrollan un axón. (C) Media de la longitud axonal de neuronas de 4 DIV tratadas con DMSO (control), TSA 100 nM y TSA 200 nM de 48 a 96 horas. Los datos de B y C representan la media \pm desviación estándar de 3 experimentos independientes (300 neuronas/ condición experimental de cada experimento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (D) Niveles (en unidades arbitrarias, u.a.) normalizados de Ac- α -tubulina/ α -tubulina obtenidos a partir de extractos de neuronas tratadas con DMSO, TSA 100 nM y TSA 200 nM durante 24 horas y extraídos durante 5 minutos con tampón PHEM modificado con taxol, para retirar la tubulina no ensamblada (ver sección materiales y métodos). La gráfica representa la media \pm desviación estándar, N=3 experimentos independientes * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Con el fin de comprobar si los resultados obtenidos eran debidos a la actividad de HDAC6, y minimizar los efectos inespecíficos sobre la actividad de otras HDAC, realizamos una segunda aproximación, más restrictiva, con el compuesto tubacina. La tubacina es un inhibidor (no comercial) específico de la actividad de HDAC6 que se ha demostrado no afecta al grado de acetilación de histonas, ni modifica los patrones de expresión génica (Haggarty et al., 2003). Así pues, repetimos el ensayo anterior estableciendo previamente una concentración óptima para mantener una inhibición continuada de HDAC6, que no afectase a la viabilidad celular. Como controles se emplearon DMSO (vehículo), y un análogo inactivo de tubacina, niltubacina, a la misma concentración. Después de 48 horas *in vitro* el tratamiento con tubacina redujo notablemente la actividad de HDAC6 e incrementó los niveles totales de α -tubulina acetilada (**fig. R6 A**). Igualmente, un porcentaje significativo de neuronas tratadas con tubacina 10 μM ($43.09 \pm 8.76 \%$) fue incapaz de desarrollar un axón (procesos tau-1 positivos), a diferencia del porcentaje de neuronas control ($70.75 \pm 8.27 \%$). En contraste, la exposición a niltubacina no afectó al proceso de formación axonal, exhibiendo valores similares al control ($69.18 \pm 6.85 \%$) (**fig. R6 B**). Para determinar si, al igual que con TSA, la inhibición de HDAC6 reducía

el crecimiento axonal, analizamos el efecto de tubacina y niltubacina en neuronas que ya habían desarrollado un axón. Después de 48 horas *in vitro* la longitud media axonal en neuronas control fue de $102.15 \pm 5.86 \mu\text{m}$, y dos días después los axones alcanzaron una media de $295.45 \pm 2.46 \mu\text{m}$. Sin embargo, el tratamiento con tubacina $10 \mu\text{M}$ de 48 a 96 horas produjo una reducción significativa de la longitud axonal ($212.45 \pm 25.3 \mu\text{m}$), mientras que el tratamiento con niltubacina no afectó a la longitud axonal ($297.79 \pm 44.49 \mu\text{m}$) (**fig. R6 C**). Para confirmar el papel de HDAC6 durante el crecimiento axonal, llevamos a cabo una última aproximación

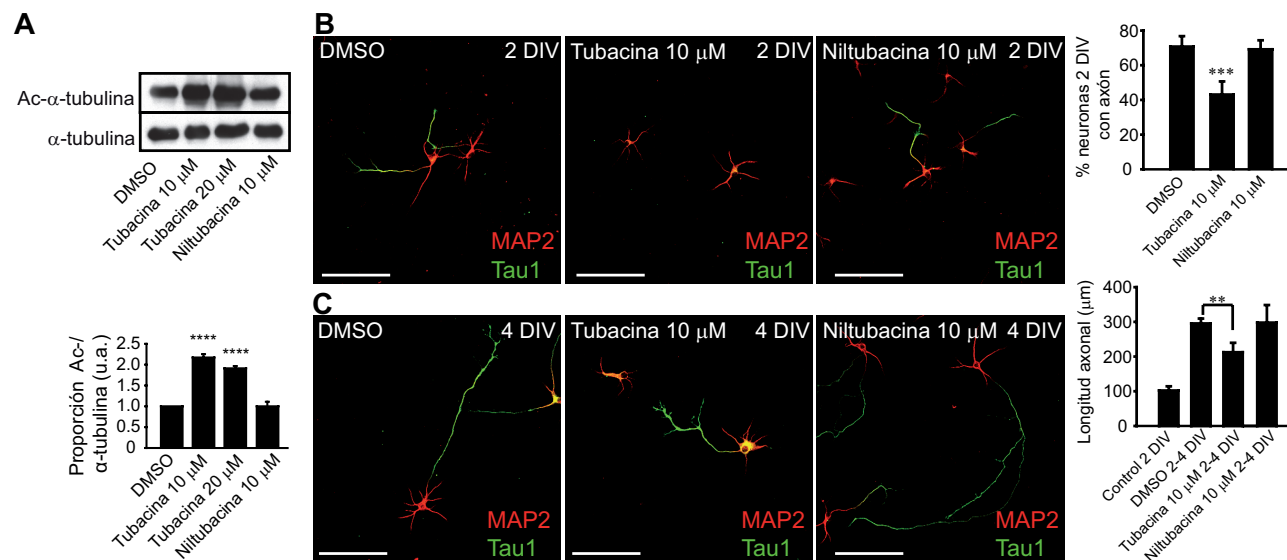


Figura R6. La inhibición de HDAC6 afecta a la formación y a la elongación axonal. (A) A partir de extractos totales de neuronas tratadas con DMSO, tubacina (10 y 20 μM) o niltubacina (10 μM) durante 48 horas, se analizaron los niveles de Ac-α-tubulina y α-tubulina mediante *Western-blot*. La gráfica inferior representa los niveles (en unidades arbitrarias, u.a.) de Ac-α-tubulina /α-tubulina normalizados al control (media ± error estándar, N=3 experimentos independientes). **** $p < 0.0001$. (B) Neuronas de hipocampo se cultivaron durante 48 horas en presencia de vehículo (DMSO), inhibidor de HDAC6, tubacina 10 μM o niltubacina 10 μM y se incubaron con anticuerpos frente a tau-1 y MAP2. La gráfica representa el porcentaje de neuronas tau-1 positivas (media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes, 500 neuronas/condición experimental de cada experimento). *** $p < 0.001$. (C) Neuronas de hipocampo de 4 DIV se cultivaron de 2 a 4 días con DMSO, tubacina 10 μM o niltubacina 10 μM y se procesaron como se indica en A. La gráfica indica la longitud media axonal. Los datos representan la media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes (150 neuronas/ condición experimental de cada experimento) ** $p < 0.01$. Barra de escala = 100 μm.

empleando un sistema genético de silenciamiento (*knock-down*) mediante la técnica de ARN de interferencia (shRNA). Debido al porcentaje relativamente bajo de neuronas que pueden ser nucleofectadas, empleamos células N2a para confirmar la reducción de la expresión de HDAC6 y seleccionar los interferentes de mayor eficacia. A partir de extractos de células N2a, transfectadas con diferentes interferentes comerciales durante 3 días, realizamos ensayos de *Western-blot* y escogimos los dos ARN de interferencia que más reducían la expresión endógena de HDAC6 (alrededor de un 50 %) (**fig. R7 A**). Igualmente, comprobamos que incrementaban los niveles de α-tubulina acetilada y eran capaces de reducir significativamente los niveles de la expresión exógena de HDAC6-Flag (**fig. R7 B**). Dada la similitud de los datos obtenidos para los dos interferentes de HDAC6, sólo incluimos las imágenes representativas de uno de ellos en los apartados posteriores. Una vez confirmada la efectividad de los interferentes, nucleofectamos neuronas de hipocampo con plásmidos que expresaban GFP a la vez que uno de los dos shRNA dirigidos contra HDAC6, o un shRNA *scramble* (secuencia control del interferente), además de un plásmido GFP como control suplementario. Las neuronas se fijaron después de 3 DIV y se realizaron tinciones para tau-1 (**fig. R7 C**) para cuantificar la longitud axonal (**fig. R7 D**). Las neuronas nucleofectadas con plásmidos que expresaban GFP o el shRNA *scramble* desarrollaron axones de una longitud media de $339.25 \pm 11.81 \mu\text{m}$ o $326.90 \pm 9.61 \mu\text{m}$, respectivamente. En contraste, las neuronas nucleofectadas con los shRNA HDAC6 1 ó 2 mostraron una reducción significativa de la longitud axonal llegando a $221.33 \pm 8.11 \mu\text{m}$ y $263.99 \pm 9.21 \mu\text{m}$, respectivamente (**fig. R7 C y D**).

A continuación, utilizando las neuronas del mismo experimento realizamos una tinción contra HDAC6 y comprobamos una reducción global de la proteína en neuronas nucleofectadas con shRNA 1 (**fig. R8 A y C**). Sorprendentemente, la reducción fue más notable en el axón donde HDAC6 estaba prácticamente ausente (**fig. R8 A y B**).

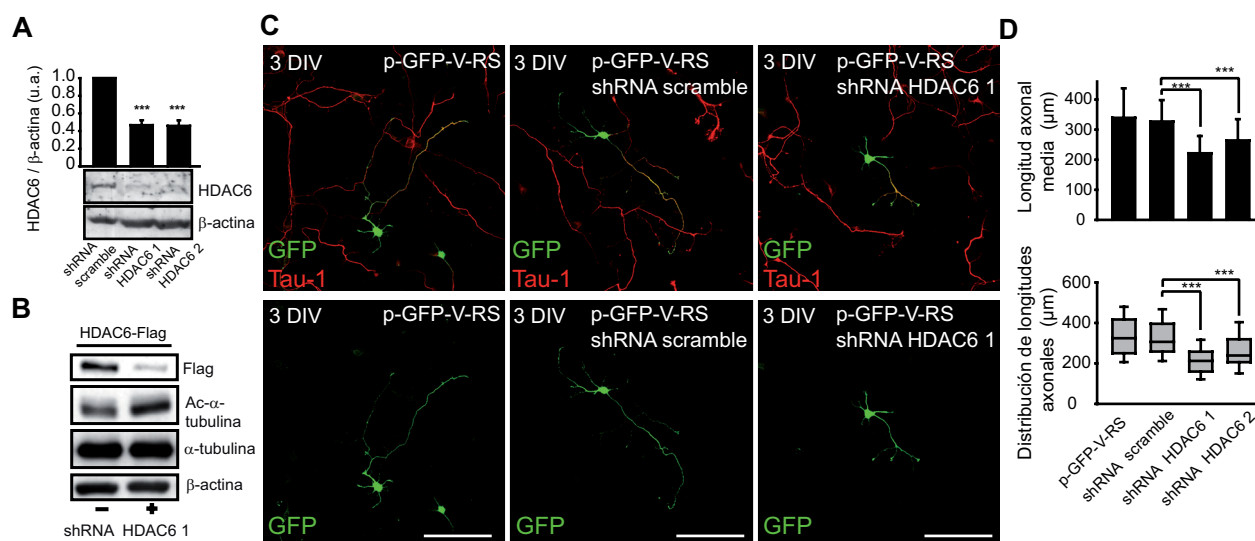


Figura R7. La supresión de HDAC6 con interferencia shRNA reduce la elongación axonal en neuronas de hipocampo. (A) Los niveles de HDAC6 endógena en células N2a cultivadas durante 3 días son suprimidos con la expresión de dos shRNAs de HDAC6 diferentes. La gráfica representa los niveles de expresión de HDAC6 normalizados a β -actina (media \pm error estándar, N=3 experimentos independientes). *** $p < 0.001$. (B) La expresión de shRNA HDAC6 reduce los niveles de HDAC6-flag y eleva los niveles de Ac- α -tubulina. (C) Neuronas de hipocampo de 3 DIV nucleofectadas con plásmidos GFP (pGFP-V-RS) que expresan sólo GFP, ARN *scramble* o ARN de interferencia de HDAC6 (shRNA HDAC6 1 ó 2). Barra de escala = 100 μ m. (D) Cuantificación de la longitud axonal de las neuronas descritas en C (media \pm desviación estándar, N=3 experimentos independientes, 100 neuronas/ condición experimental de cada experimento). *** $p < 0.001$. El diagrama inferior muestra la distribución de la longitud axonal de las neuronas cuantificadas en D. *** $p < 0.001$.

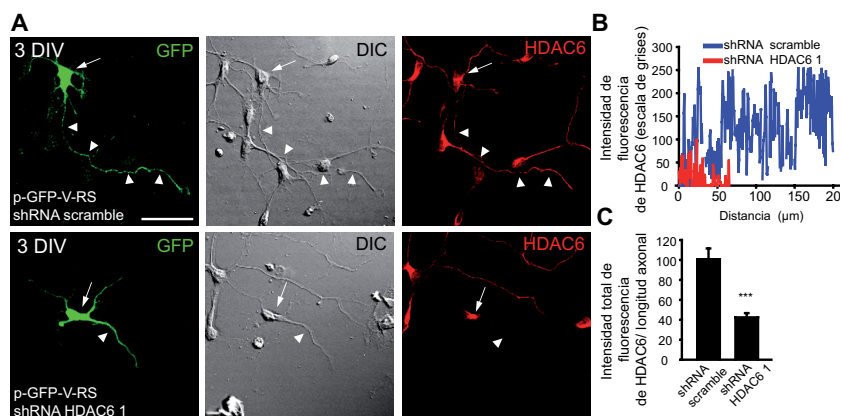


Figura R8. Cuantificación de la expresión de HDAC6 en neuronas de hipocampo nucleofectadas con shRNA *scramble* y shRNA HDAC6. (A) Expresión de HDAC6 e imágenes DIC de neuronas control shRNA *scramble* y shRNA HDAC6. Las flechas señalan el soma y las puntas de flecha el axón. Barra de escala = 50 μ m (B) Intensidad de fluorescencia de HDAC6 a lo largo del axón de las neuronas mostradas en A. (C) Intensidad de fluorescencia total de HDAC6/ μ m. Los datos representan la media normalizada de 50 neuronas de cada grupo. *** $p < 0.001$.

Dado que la pérdida de actividad de HDAC6 induce un incremento en los niveles de α -tubulina acetilada y HDAC6 se concentra preferentemente en el axón, nuestro siguiente objetivo se centró en el análisis del patrón de distribución de α -tubulina acetilada en neuronas de hipocampo donde se hallaba comprometida la actividad de HDAC6. Así pues, en neuronas tratadas con TSA, tubacina o nucleofectadas con el interferente de HDAC6 observamos un incremento generalizado de α -tubulina acetilada en toda la neurona, con una pérdida considerable del patrón de concentración creciente hacia la zona distal (**fig. R9**). A la vista de los resultados obtenidos, la pérdida de actividad de HDAC6 parece ralentizar el crecimiento axonal como consecuencia de la modificación en los niveles de α -tubulina acetilada.

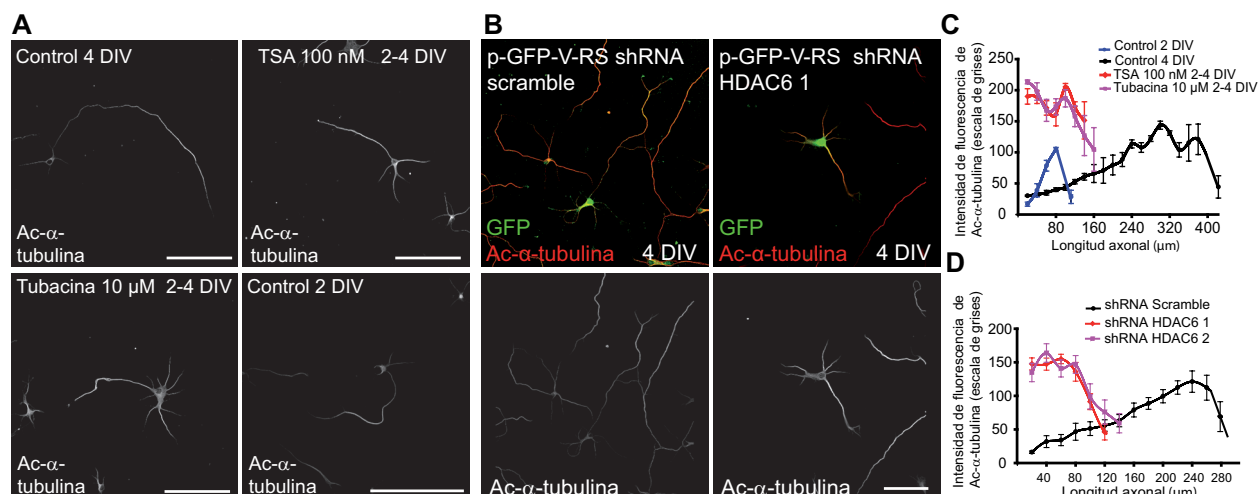


Figura R9. La inhibición y supresión de HDAC6 aumenta los niveles de α -tubulina acetilada en neuronas de hipocampo. (A) Neuronas de 2 DIV (abajo, derecha) y neuronas de 4 DIV tratadas con DMSO (control) TSA 100 nM o tubacina 10 μ M y teñidas frente a α -tubulina acetilada. Barra de escala = 100 μ m. (B) Neuronas de hipocampo nucleofectadas con plásmidos GFP (pGFP-V-RS) que expresan ARN *scramble* o ARN de interferencia de HDAC6 (shRNA HDAC6 1 o 2) y teñidas con un anticuerpo anti-Ac- α -tubulina (rojo). Barra de escala = 100 μ m. (C,D) Intensidad de fluorescencia de Ac- α -tubulina a lo largo de axones de neuronas tratadas como se indica en A (gráfica superior) o en B (gráfica inferior). Las gráficas en C y D representan la media \pm error estándar de α -tubulina acetilada de 5 neuronas de cada condición experimental. Cada punto de la gráfica indica la media de la intensidad obtenida cada 20 μ m.

HDAC6 puede deacetilar otros sustratos como cortactina, proteína implicada en la polimerización de actina. Teniendo en cuenta la importancia de la estructura de actina en el cono de crecimiento durante el proceso de axonogénesis, decidimos examinar cualitativamente las regiones de mayor concentración de F-actina en los conos de crecimiento neuronales. Como se muestra en la figura R10, neuronas donde la actividad de HDAC6 está inhibida muestran una notable pérdida del marcaje de F-actina en los conos de crecimiento neurítico (fig. R10 A y B) y axonal (fig. R10 A y C). Estos nuevos datos sugieren que, al menos en parte, el fenotipo descrito hasta el momento puede ser una consecuencia de la alteración en la dinámica de actina del cono de crecimiento axonal.

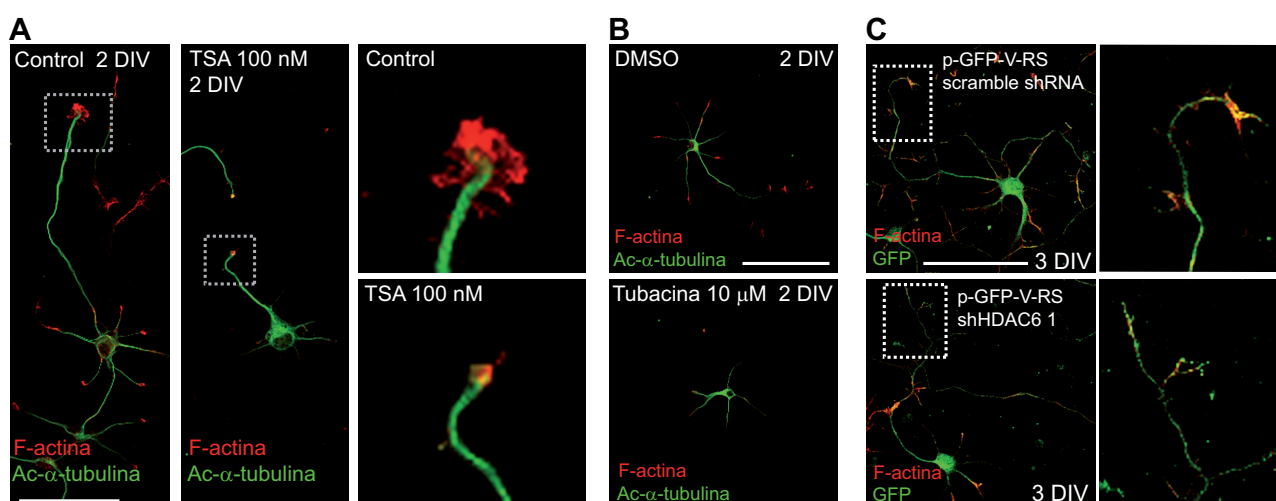


Figura R10. La inhibición y supresión de HDAC6 altera la dinámica de microfilamentos de actina. (A) Neuronas de hipocampo de 2 DIV tratadas con TSA 100 nM se fijaron y tiñeron con un anticuerpo anti-tubulina tirosinada y con faloidina-594 para poner de manifiesto F-actina. Barra de escala = 25 μ m. (B) Neuronas de hipocampo de 2 DIV tratadas con tubacina 10 μ M se tiñeron como se indica en A. Barra de escala = 100 μ m. (C) Neuronas de hipocampo nucleofectadas con plásmidos GFP que expresan ARN *scramble* o ARN de interferencia de HDAC6 se fijaron a 3 días y se tiñeron con faloidina-594. Barra de escala = 100 μ m. Las imágenes de la derecha en A y en C muestran una ampliación de los conos de crecimiento.

3.3 La función de HDAC6 en la elongación axonal es dependiente de su actividad deacetilasa y no de su unión a proteínas ubiquitinadas

HDAC6 posee otras funciones relacionadas no sólo con sus dominios deacetilasa, sino con su región UBD (*ubiquitin binding domain*), capaz de unir cadenas de mono y poliubiquitina. En este sentido, recientemente se ha descrito una nueva función de HDAC6 en elongación dendrítica relacionada con esta región de unión a ubiquitina (Kim et al., 2009). Con el fin de determinar si esta región podría interferir en el proceso de elongación axonal, empleamos un plásmido de HDAC6-GFP con una delección en la región C-terminal (donde se encuentra la región UBD), cedido amablemente por el Dr. Yao (HDAC6-ΔUBD-GFP). Esta región impide la unión de proteínas ubiquitinadas pero no influye en sus dominios catalíticos (Boyault et al., 2007; Gao et al., 2010) con lo cual, se puede valorar las funciones de HDAC6 exclusivas de su función deacetilasa por competición con la enzima endógena. Para completar el ensayo utilizamos otro plásmido de HDAC6, deficiente en la actividad deacetilasa, que posee mutaciones puntuales en los dos dominios deacetilasa, cedido por el Dr. Sánchez- Madrid (Valenzuela-Fernandez et al., 2005) (**fig. R11 A**). Neuronas nucleofectadas con los plásmidos HDAC6-GFP (como control), HDAC6-H216A/H611A-GFP (inactivo para la función deacetilasa) y HDAC6-ΔUBD-GFP (sin la región UBD) fueron mantenidas en cultivo durante 3 días. Después de su fijación se incubaron con anticuerpos para tau-1 y se cuantificó su longitud axonal (**fig. R11 B y C**). En paralelo realizamos transfecciones en células N2a con los mismos plásmidos para evaluar los niveles de α-tubulina acetilada (**fig. R11 D**).

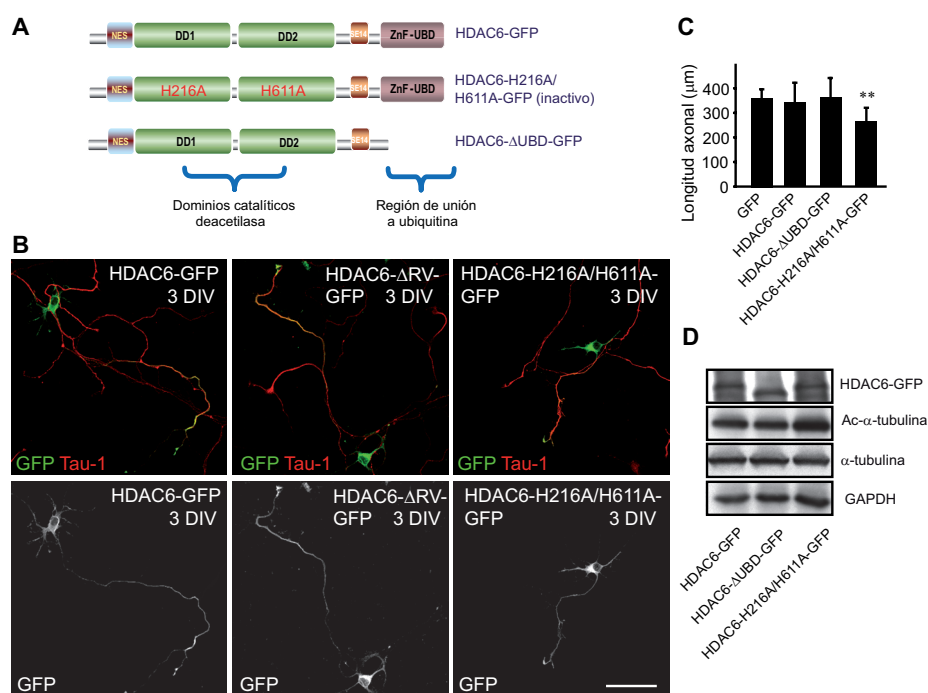


Figura R11. Los efectos de HDAC6 sobre elongación axonal son dependientes de su actividad deacetilasa. (A) Esquema representativo de los distintos plásmidos de HDAC6 empleados. (B) Neuronas de hipocampo se nucleofectaron con los plásmidos mostrados en A, se fijaron a 3 DIV y se tiñeron con un anticuerpo anti-tau-1. Barra de escala = 100 μm. (C) Longitud media axonal de las neuronas descritas en B. Los datos representan la media ± desviación estándar de N=3 experimentos independientes (50 neuronas/ condición experimental de cada experimento). **p<0.01. (D) Niveles de HDAC6-GFP, Ac-α-tubulina, α-tubulina y GAPDH (control de carga) obtenidos a partir de extractos de células N2a transfectadas durante 3 DIV.

De forma similar a experimentos anteriores (**fig. R4**), la expresión exógena de HDAC6 no alteró la longitud axonal media ($326.89 \pm 97.67 \mu\text{m}$) en comparación con el control GFP ($334.01 \pm 61.26 \mu\text{m}$) al igual que la expresión de HDAC6-ΔUBD-GFP ($337.03 \pm 90.72 \mu\text{m}$). Sin embargo, la introducción del mutante inactivo en la función deacetilasa de HDAC6 redujo significativamente la longitud axonal a $276.07 \pm 72.46 \mu\text{m}$. Observando el patrón de localización de las distintas proteínas HDAC6-GFP, detectamos un cambio en la distribución axonal de HDAC6-H216A/H611A-GFP (mutante inactivo) donde, claramente, se pierde la concentración en la región distal. Este cambio nos sugiere una relación entre la función de HDAC6 y su localización concentrada en el axón. Finalmente, al comparar los niveles de α-tubulina acetilada en las distintas condiciones de transfección observamos que, sólo en el caso de la expresión de la proteína inactiva, los niveles se veían

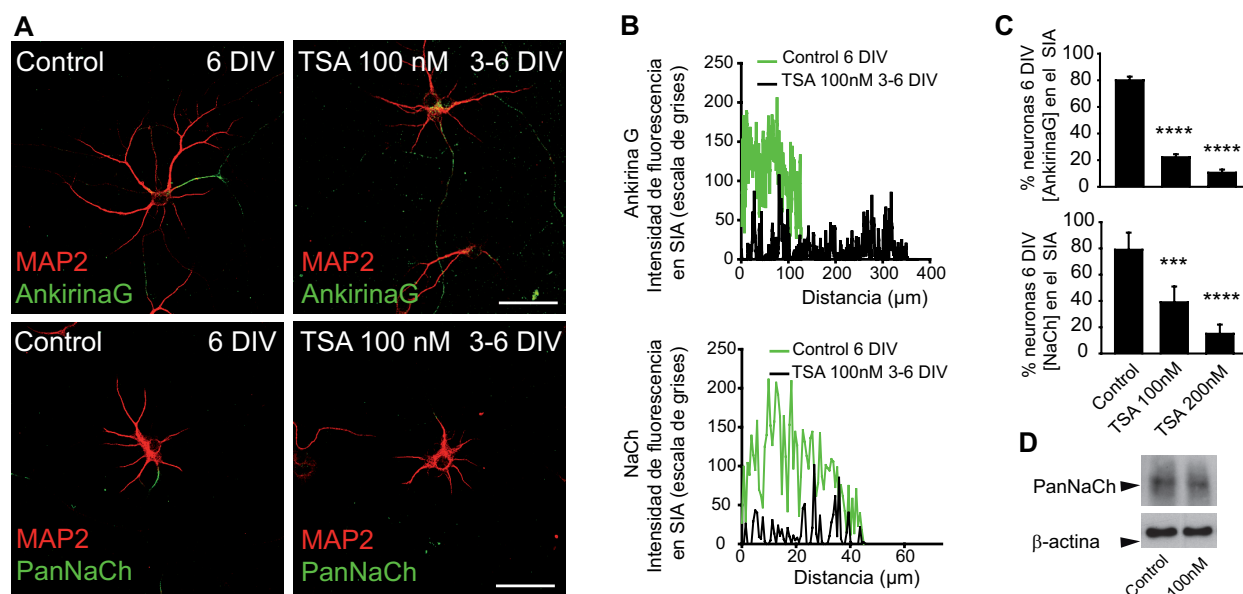
incrementados (**fig. R11 D**). Por lo tanto, podemos concluir que los efectos observados en elongación axonal son dependientes exclusivamente de la función deacetilasa de HDAC6.

4 ESTUDIO DEL PAPEL DE HDAC6 EN LA FORMACIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

En vista de los resultados obtenidos en desarrollo axonal, nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto de HDAC6 en el desarrollo del SIA, evento crítico en la maduración neuronal posterior a la formación axonal. Para abordar este objetivo, decidimos estudiar la distribución de determinadas proteínas asociadas al SIA en ensayos de inhibición e interferencia génica de HDAC6.

4.1 La función de HDAC6 es necesaria para la concentración de proteínas en el segmento inicial del axón durante su formación

El SIA, como se ha explicado anteriormente, es un subdominio axonal único en su composición y estructura. Su formación es temprana, comenzando con la acumulación progresiva de ankirina G que puede detectarse desde las primeras 48 horas *in vitro*, alrededor del estadio 3 (Boiko et al., 2007; Sanchez-Ponce et al., 2008). Ankirina G es la proteína encargada de orquestar y dirigir el ensamblaje posterior en el SIA de muchas proteínas y canales iónicos, entre ellos, canales de sodio dependiente de voltaje. Nuestros datos indican que los microtúbulos del SIA tienen características diferenciales con el resto del axón y el compartimiento somatodendrítico (**fig. R1**). Así pues, decidimos estudiar si la función deacetilasa de HDAC6 podría afectar a la formación y anclaje de proteínas en el SIA. Para ello escogimos ankirina G y los canales de sodio voltaje dependientes como los marcadores adecuados para este análisis.



En primer lugar estudiamos el efecto de la inhibición de HDAC6 utilizando los compuestos inhibidores de la actividad HDAC6 TSA y tubacina, anteriormente caracterizados. Dado que la formación de la doble barrera del SIA es posterior a la concentración de ankirina G, aproximadamente a los 3 días de diferenciación *in vitro*, establecimos el tiempo de inhibición entre los 3 y 6 días posteriores al plaqueo neuronal. Después de los tratamientos fijamos las neuronas y realizamos ensayos de inmunocitoquímica con anticuerpos dirigidos contra MAP2 y ankirina G o canales de sodio dependientes de voltaje. Las neuronas expuestas de 3 a 6 DIV a TSA 100 nM mostraron una clara pérdida de concentración en el SIA de ankirina G y canales de sodio (**fig. R12 A**). De hecho, el tratamiento con TSA (100 nM) redujo significativamente el porcentaje de ankirina G concentrada en el SIA de $80.01 \pm 2.73 \%$ en neuronas control a $22.19 \pm 2.17 \%$. Un análisis más exhaustivo demostró que ankirina G no sólo perdía su concentración específica en SIA, sino que cambiaba su distribución mostrando un patrón difuso y continuo a lo largo del axón (**fig. R12 A y B**). Los canales de sodio igualmente mermaron su concentración en SIA con la exposición a TSA hasta un $39 \pm 12 \%$, comparado con el $79 \pm 13 \%$ de las neuronas control (**fig. R12 C**). A diferencia de ankirina G, tras la pérdida de concentración de los canales de sodio, no se observó su presencia a lo largo del axón (**fig. R12 A y B**). Como la expresión de canales de sodio no parece verse afectada cuantitativamente (**fig. R12 D**) una posible explicación para la ausencia de marcaje podría ser que la proteína realmente difunda a lo largo del axón (interaccionando con ankirina G), y sus niveles se hallen por debajo de la capacidad de detección del anticuerpo.

De forma similar, el tratamiento con tubacina 10 μ M también disminuyó la concentración de ambas proteínas en el SIA (**fig. R13**). Mientras que neuronas control concentraban ankirina G y canales de sodio en un $76.99 \pm 4.93 \%$ (ankirina G) y un $88.16 \pm 5.76 \%$ (canales de sodio), el tratamiento de 3 días con tubacina disminuyó este valor al $56.47 \pm 4.94 \%$ y $65.19 \pm 8.89 \%$, respectivamente. Por el contrario, el tratamiento con niltubacina no produjo cambios significativos comparado con el grupo control.

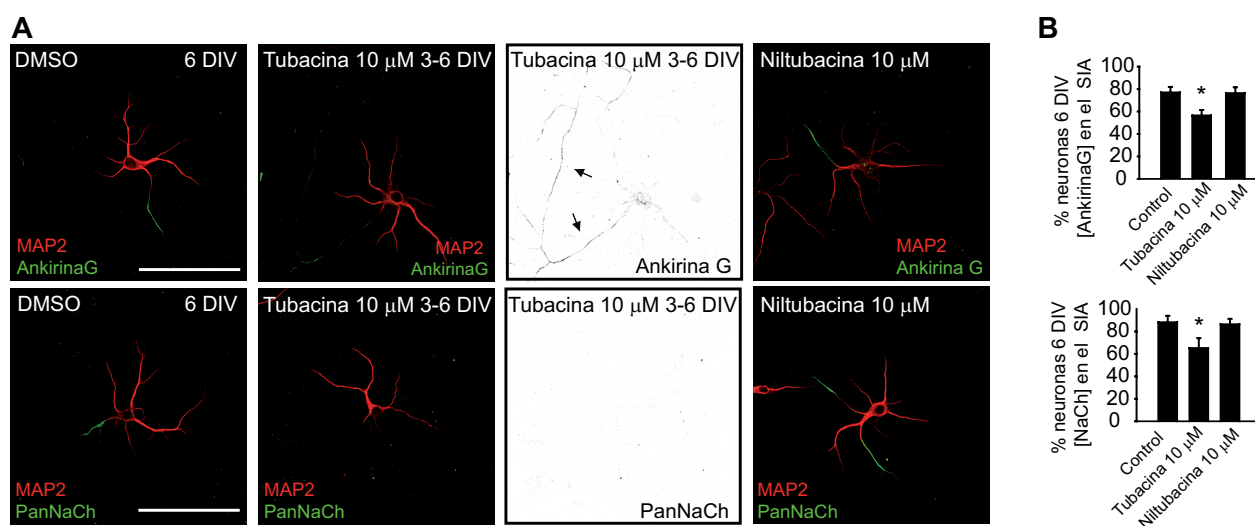


Figura R13. El tratamiento con tubacina disminuye la concentración de ankirina G y canales de sodio en el SIA. (A) Neuronas de 6 DIV controles o tratadas con tubacina 10 μ M de 3 a 6 días, teñidas con el marcador somatodendrítico MAP2 (rojo) y los marcadores ankirina G o PanNaCh (verde). La inversión en escala de grises de las imágenes centrales muestra con mejor contraste la distribución de ankirina G a lo largo del axón y la ausencia de canales de sodio dependientes de voltaje. Las flechas indican la posición del axón. Barra de escala = 100 μ m. **(B)** Porcentaje de neuronas que muestran una concentración específica en SIA de canales de sodio dependientes de voltaje y ankirina G. La gráfica representa la media \pm error estándar de tres experimentos independientes (600 neuronas / condición experimental de cada experimento). * $p < 0.05$.

Finalmente, analizamos la distribución de proteínas del SIA después de la supresión de HDAC6, empleando de nuevo el modelo de supresión génica con interferentes. Nucleofectamos neuronas de hipocampo con los plásmidos: GFP, shRNA *scramble* y shRNA HDAC6 1 y 2, y las mantuvimos durante 3 días en cultivo. Tras su fijación y posterior tinción con ankirina G o canales de sodio se analizó la concentración de ambas proteínas en el SIA (**fig. R14**). Sólo el $48.41 \pm 2.2\%$ y el $42.72 \pm 2.99\%$ de las neuronas nucleofectadas con el interferente de HDAC6 1 ó 2 mostraron una concentración normal de ankirina G en el SIA (**fig. R14 A y C**). En el mismo experimento el $38.66 \pm 3.47\%$ y el $48.83 \pm 4.02\%$ de las neuronas nucleofectadas con el interferente de HDAC6 1 ó 2 presentaban canales de sodio en el SIA (**fig. R14 B y C**). La nucleofección con GFP o shRNA *scramble* resultó en un número superior de neuronas con ankirina G en el SIA ($66.72 \pm 4.87\%$ en neuronas GFP control, y $64.29 \pm 3.87\%$ en neuronas shRNA *scramble*) y canales de sodio ($63.72 \pm 3.78\%$ en neuronas GFP, y $65.01 \pm 1.69\%$ en neuronas shRNA *scramble*). La concentración reducida de ankirina G debido a la interferencia en la expresión de HDAC6 se asoció nuevamente con una tinción de ankirina G a lo largo del axón (**fig. R14 A**), similar al que producían los tratamientos con tubacina y TSA.

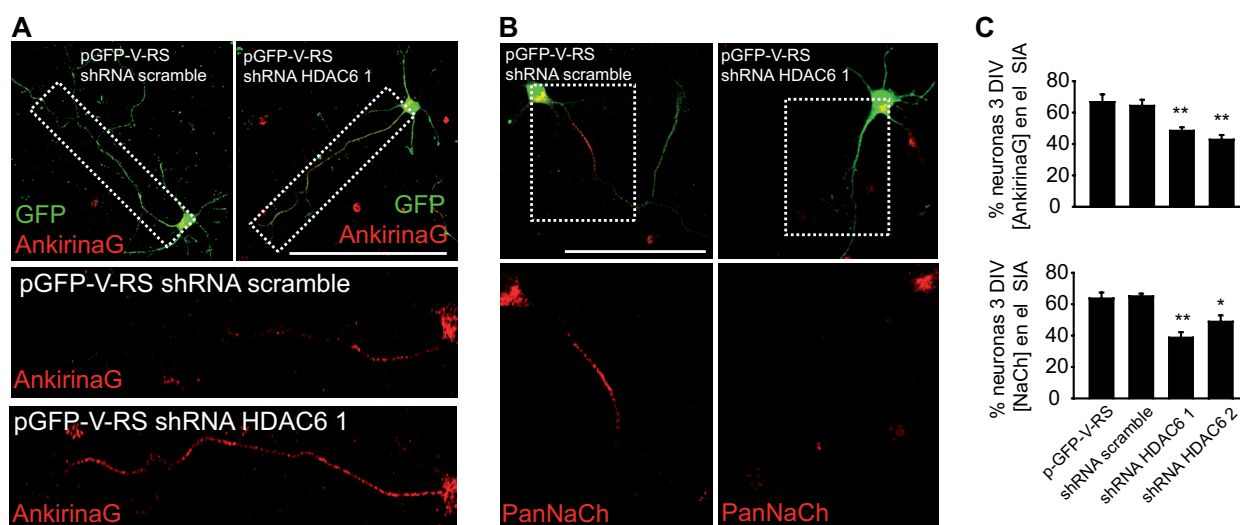


Figura R14. La supresión de HDAC6 afecta a la localización de ankirina G y canales de sodio en el SIA. (A) Neuronas de hipocampo de 3 DIV nucleofectadas con plásmidos GFP (pGFP-V-RS) que expresan shRNA HDAC6 o un control *scramble*. Después de 3 días de cultivo, las neuronas se tiñeron con el marcador ankirina G y la morfología neuronal se caracterizó por la fluorescencia GFP. Las imágenes inferiores muestran una ampliación de la zona seleccionada en los paneles superiores. **(B)** Las mismas neuronas de A se tiñeron con el marcador de canales de sodio PanNaCh. Las imágenes inferiores son una ampliación de los recuadros señalados en los paneles superiores. Barra de escala = 100 μ m. **(C)** Porcentaje de neuronas de hipocampo de 3 DIV que expresan sólo GFP, ARN *scramble* o ARN de interferencia de HDAC6 (shRNA HDAC6 1 o 2) y presentan los dos marcadores señalados en A y B concentrados en segmento inicial. Los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos independientes (100 neuronas / condición experimental de cada experimento). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

5 ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LOS MICROTÚBULOS EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Una vez comprobado los efectos deletéreos de la pérdida de expresión y actividad de HDAC6, durante el ensamblaje inicial del SIA, decidimos profundizar en las propiedades de los MT asociados a esta estructura en estadios más maduros. En este caso, trabajamos con neuronas más desarrolladas para el empleo de técnicas de extracción.

5.1 La inhibición de tubulina deacetilasas altera la localización específica de los microtúbulos acetilados del SIA resistentes a extracción

La inhibición o supresión de HDAC6 altera el anclaje de proteínas del segmento inicial durante su formación. Dado que la acetilación de α -tubulina es una modificación presente en el citoesqueleto de MT del SIA,

decidimos evaluar si la inhibición de HDAC6 podría alterar la distribución de esta acetilación. El período de maduración del SIA se debe establecer en base a características ultraestructurales, como son la formación de una doble barrera en citoplasma y membrana. Esta barrera de difusión comienza a formarse entre los 3 y 5 DIV aproximadamente (Song et al., 2009; Brachet et al., 2010), lo que establece una ventana temporal para interferir en procesos de maduración. En este sentido, neuronas fijadas a 7 DIV, después de realizar una extracción previa con Tritón X-100 0.5 %, revelaron una concentración específica de Ac- α -tubulina en el SIA (fig. R15 B). Esta restricción específica fue abolida con una exposición previa de TSA 100 nM durante 48 horas, donde el marcaje de Ac- α -tubulina se distribuyó homogéneamente a lo largo del axón (fig. R15 C, D y E), reproduciendo el mismo patrón que ankirina G en estadios más tempranos de inhibición (figuras R12-14). En las mismas neuronas, observamos una ausencia total del marcador 14D4 en SIA (fig. R15 C) que podría deberse, como en el caso de los canales de sodio, a un fenómeno de difusión axonal que los límites de detección del anticuerpo no nos permiten comprobar. Así pues estos datos indican que un aumento en los niveles de acetilación de MT confiere propiedades similares de resistencia a detergentes específicas de proteínas del SIA.

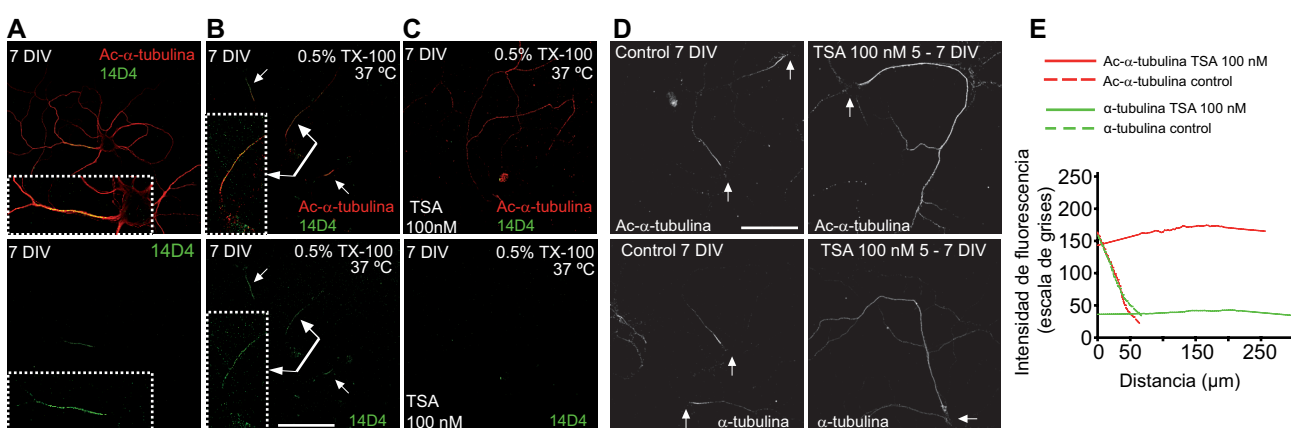


Figura R15. La inhibición de tubulina deacetilasas altera el enriquecimiento específico de los MT acetilados del SIA resistentes a extracción. (A) Expresión de Ac- α -tubulina en neuronas de 7 DIV. (B) Neuronas de 7 DIV fijadas después de la extracción con Tritón X-100 0.5 % durante 5 min a 37°C y teñidas con anticuerpos para Ac- α -tubulina y 14D4. Las flechas indican los segmentos iniciales marcados con Ac- α -tubulina (rojo) y 14D4 (verde). El recuadro muestra una ampliación del segmento inicial del axón como se indica. (C) Localización de las mismas proteínas en neuronas tratadas con TSA 100 nM y extraídas como se indica en B. (D) Inmunomarcage de Ac- α -tubulina y α -tubulina de neuronas control o tratadas con TSA 100 nM y extraídas con 0,5 % Tritón X-100. Las flechas indican la posición de los somas neuronales. Barra de escala = 100 μ m (E) Gráfico que representa la intensidad de fluorescencia de Ac- α -tubulina (líneas rojas) y α -tubulina (líneas verdes) a lo largo del axón de neuronas control (líneas punteadas) y tratadas con TSA (líneas rectas) mostradas en E. Las líneas de intensidad son el resultado de la suavización de datos, obtenidos con el programa ImageJ utilizando el software SigmaPlot.

5.2 La inhibición de tubulina deacetilasas reduce la concentración de ankirina G en el segmento inicial de neuronas maduras

Una vez evaluado el efecto de HDAC6 en etapas tempranas de formación del segmento inicial, nos propusimos estudiar el mismo efecto en estadios de maduración posterior. Tal y como establece la bibliografía más reciente, neuronas de 10 DIV presentan un segmento inicial maduro en base a dos criterios: agrupación y cohesión de la mayoría de proteínas y canales, y consolidación de una doble barrera de difusión (Song et al., 2009; Brachet et al., 2010). Empleamos para estos ensayos neuronas de días posteriores a 10 DIV. En primer lugar analizamos el efecto del inhibidor TSA sobre neuronas de 12 DIV. Después de 2 días de tratamiento, las fijamos y teñimos con anticuerpos dirigidos contra ankirina G (proteína clave de anclaje del SIA) y 14D4 (marcador del SIA asociada a MT (Buffington et al., 2012)). Como se muestra en la figura 16R, en neuronas tratadas con el vehículo (DMSO) se detectan niveles elevados de ambas proteínas en el SIA. Sin embargo, el

tratamiento con TSA reduce sus niveles de forma notable (**fig. 16R A**). A continuación, realizamos el mismo ensayo con neuronas de 15 DIV y cuantificamos la intensidad de fluorescencia de ankirina G a partir de neuronas escogidas al azar de ambos tratamientos (**fig. R16 B y C**). El tratamiento con TSA 100 nM durante dos días redujo los niveles de ankirina G significativamente, pero aún pudo observarse su concentración en el SIA, a diferencia de lo observado en neuronas durante el desarrollo inicial del SIA (véase figura R12). Si bien la inhibición de HDAC6, y por lo tanto los niveles de α -tubulina acetilada, durante las etapas iniciales de formación del segmento inicial produce un efecto de difusión a lo largo del axón de ankirina G, su inhibición en neuronas maduras reduce su anclaje específico. Estos nuevos datos sugieren que la actividad de acetilasa regula en parte los niveles de ankirina G en el SIA tras su maduración, y que existe un cambio en las propiedades del axón y/o del segmento inicial del axón durante el proceso de maduración posterior a su formación.

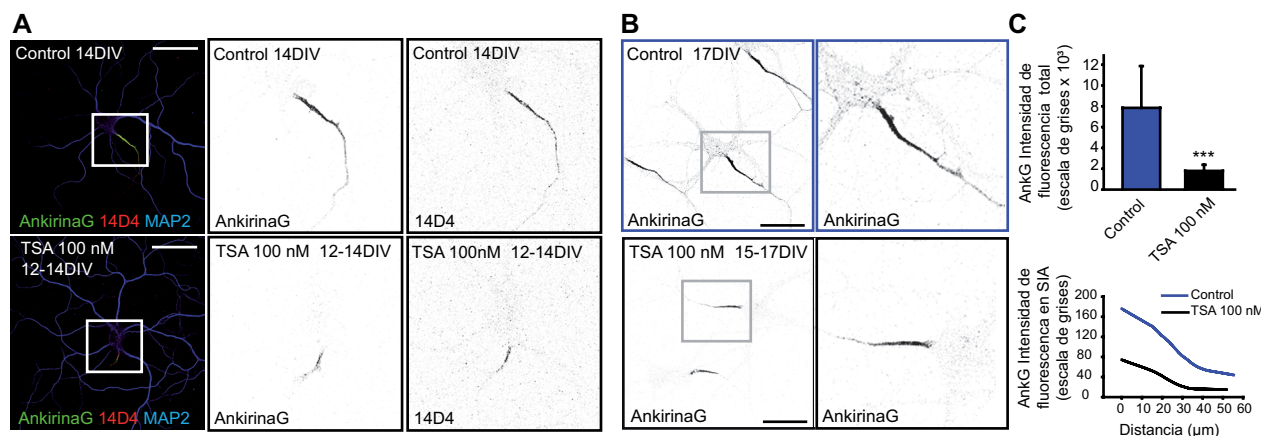


Figura R16. La inhibición de deacetilasas altera los niveles de ankirina G en el segmento inicial. (A) Neuronas de 14 DIV tratadas con DMSO o TSA 100 nM de 12 a 14 días se fijaron y tiñeron con los marcadores: ankirina G (verde), 14D4 (rojo) y MAP2 (azul). La inversión en escala de grises muestra, con mejor contraste la intensidad de cada marcador en ambos tratamientos. **(B)** Neuronas de hipocampo de 15 días tratadas durante los dos días posteriores con DMSO (imágenes superiores) o TSA 100 nM (imágenes inferiores). Después de fijarse, las neuronas se incubaron con anticuerpos dirigidos contra ankirina G y 14D4. Barra de escala = 50 μ m **(C)** Intensidad de fluorescencia del marcador ankirina G. El gráfico superior representa los niveles totales de proteína en el segmento inicial y el inferior la intensidad de fluorescencia a lo largo de la longitud del SIA. Los datos se obtuvieron de 20 neuronas escogidas al azar de 2 experimentos independientes (media \pm desviación típica). *** $p < 0.001$.

5.3 La alteración farmacológica de la estabilidad de microtúbulos modifica las propiedades de unión de proteínas del SIA.

A la vista de los resultados anteriores, decidimos profundizar más en la influencia de la red de MT sobre el anclaje y localización de proteínas del SIA. En este sentido, ciertas drogas antimitóticas pueden modular la dinámica de polimerización/despolimerización de MT. El taxol (o paclitaxel) estimula la polimerización de tubulina, reduciendo la velocidad de acortamiento del MT (Derry et al., 1995; Wilson et al., 1999), mientras que el nocodazol desestabiliza los MT incrementando su tasa de catástrofe (Vasquez et al., 1997). Así pues, realizamos tratamientos con ambas drogas a tiempos largos (concentración 10 nM durante 72 horas) y tiempos cortos (concentración 50 nM durante 24 horas), y evaluamos su repercusión en el anclaje de proteínas del SIA. En ambos tipos de tratamiento, observamos el mismo fenotipo, por lo que sólo mostramos los datos de uno de ellos (**fig. R17**). Como era de esperar, el tratamiento con nocodazol redujo de forma drástica la expresión de 14D4 en el SIA, y de forma menos evidente, pero claramente visible, se vio afectada la concentración de ankirina G. De forma similar al tratamiento con TSA, el taxol disminuyó notablemente la concentración de ankirina G mientras que 14D4, acorde con trabajos anteriores (Schultz et al., 2006; Buffington et al., 2012) mantuvo su localización específica en SIA, si bien mostró un ligero alargamiento (**fig. R17 B**). Estos resultados confirman que la integridad de la dinámica de MT es un factor que regula la localización de proteínas en el SIA.

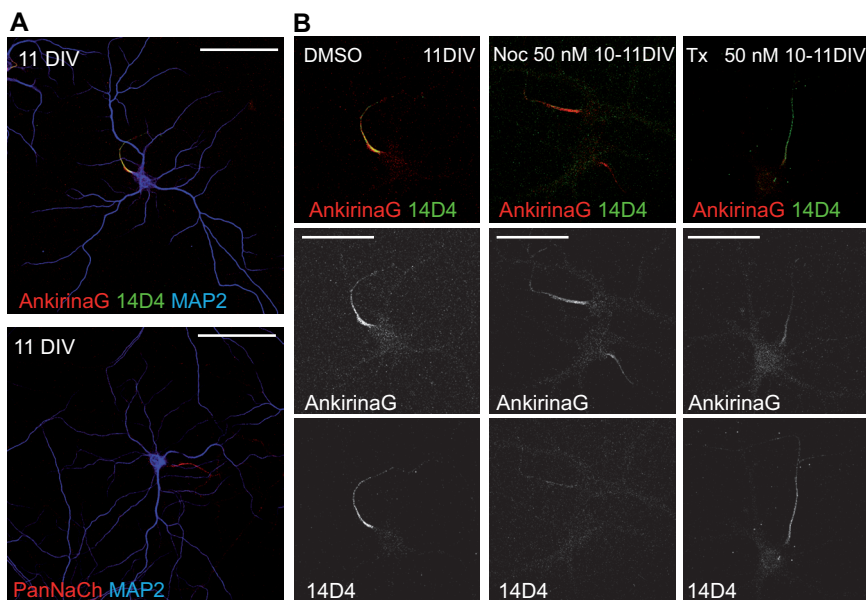


Figura R17. Fármacos que afectan a los procesos de inestabilidad dinámica de MT producen cambios en la distribución de proteínas del SIA en neuronas maduras. (A) Neuronas de hipocampo de 11 DIV incubadas con anticuerpos para ankirina G (verde), 14D4 (rojo) y MAP2 (azul) en la imagen superior y PanNaCh (rojo) y MAP2 (azul) en la imagen inferior. (B) Neuronas de 11 DIV tratadas durante 24 horas con los compuestos: DMSO (vehículo), nocodazol (Noc) 50 nM y taxol (Tx) 50 nM y teñidas con los marcadores de segmento inicial ankirina G y 14D4. Los paneles inferiores muestran los marcajes por separado en escala de grises. Barra de escala = 100 μ m.

6 INFLUENCIA DE LA ACTIVIDAD DE HDAC6 SOBRE EL TRANSPORTE MEDIADO POR KINESINAS.

La acetilación de tubulina está relacionada con el transporte de proteínas y sirve como un punto de interacción para kinesinas. KIF5 o kinesina 1, está relacionada con procesos de crecimiento axonal y su reclutamiento axonal depende de la diferente estabilidad de los MT en el SIA (Nakata and Hirokawa, 2003; Jacobson et al., 2006; Konishi and Setou, 2009). Por esta razón, nos centramos específicamente en el estudio de esta kinesina.

6.1 La inhibición de HDAC6 altera la distribución polarizada de KIF5C

Nuestro siguiente objetivo fue averiguar si las modificaciones de MT observadas tras la inhibición y/o supresión de HDAC6 podían influir en la localización de KIF5. De los tres isotipos KIF5 A, KIF5C y KIF5B encontrados en cerebro los dos primeros son específicos de neuronas, por lo que escogimos KIF5C para nuestro análisis. En esta ocasión analizamos los efectos de la inhibición (TSA), supresión (shRNA HDAC6) y la pérdida de función (HDAC6-GFP H216A/H611A, mutante inactivo) de HDAC6. En primer lugar, tratamos neuronas de 3 DIV con TSA 100 nM y analizamos la distribución de KIF5C a 6 DIV. Mientras que KIF5C se detectaba preferentemente en la región distal del axón en el 89.53 ± 2.28 % de neuronas control, sólo el 29 ± 2.07 % de neuronas tratadas con TSA presentaban un claro gradiente creciente de KIF5C hacia la zona distal del axón (**fig. R18 A y B**). La pérdida de este gradiente axonal se caracterizó por una tinción homogénea de KIF5C a lo largo del axón y una concentración mayoritaria en soma, asociado a un incremento de α -tubulina acetilada en toda la neurona. A continuación nucleofectamos neuronas con los interferentes de HDAC6 y las mantuvimos en cultivo durante 4 días. Después de suprimir la expresión de HDAC6 el gradiente axonal de KIF5C estuvo presente sólo en un 61.43 ± 6.04 % y en un 53.83 ± 1.12 % de neuronas nucleofectadas con shRNA HDAC6 1 y 2, respectivamente, mientras que en neuronas *scramble* se alcanzó un 80.5 ± 3.29 % (**fig. R19 A y C**). En el caso del mutante inactivo de HDAC6 sólo un 49.7 ± 3.29 % de las neuronas presentaron una tinción en gradiente de KIF5C, a diferencia de neuronas que expresaban HDAC6-GFP (75.53 ± 1.07 %) (**fig. R19 B y C**). Tanto la introducción del mutante inactivo como la supresión con los interferentes reprodujeron el mismo fenotipo encontrado con el tratamiento de TSA, una despolarización de KIF5C claramente concentrado en el soma y a lo largo del axón, con una clara pérdida del gradiente creciente hacia el cono de crecimiento (**fig. 19R D**).

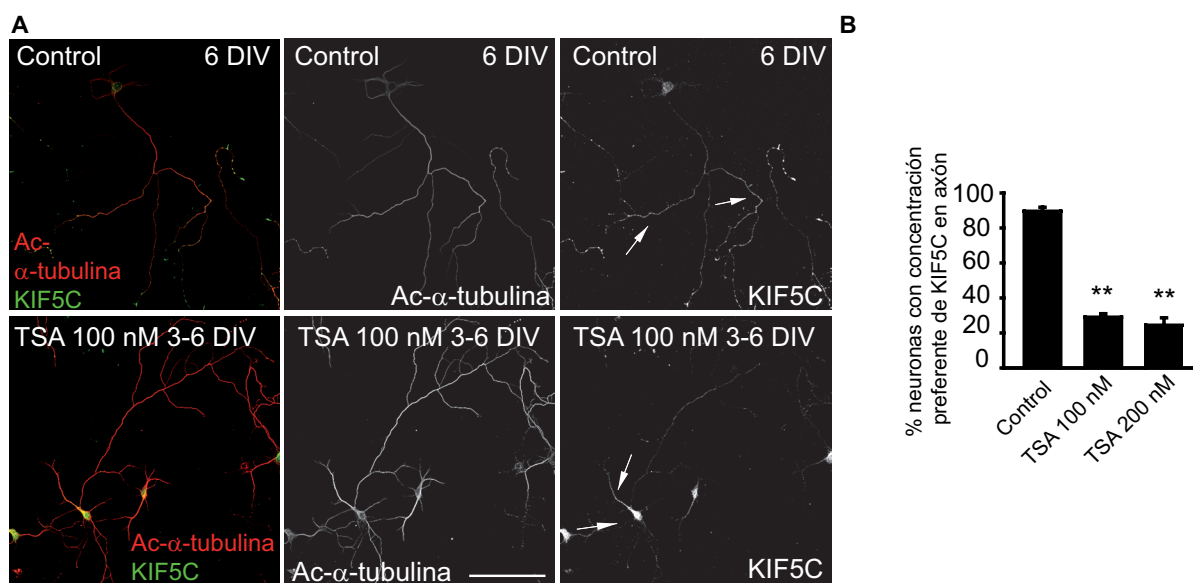


Figura R18. La inhibición de deacetilasas con TSA altera la distribución polarizada de KIF5C. (A) Localización de KIF5C y Ac- α -tubulina en neuronas de hipocampo de 6 DIV cultivadas en ausencia o presencia de TSA 100 nM de 3 a 6 DIV. Barra de escala = 100 μ m. Se observan 2 fenotipos claramente diferenciados en la localización de KIF5C: una localización en gradiente hacia el axón distal (control) y una distribución homogénea a lo largo del axón y concentrada en soma (tratamiento con TSA). Las flechas indican los lugares de mayor concentración de KIF5C en cada tratamiento (B) Porcentaje de neuronas con KIF5C concentrada específicamente en zonas distales del axón y conos de crecimiento. ** $p < 0,01$.

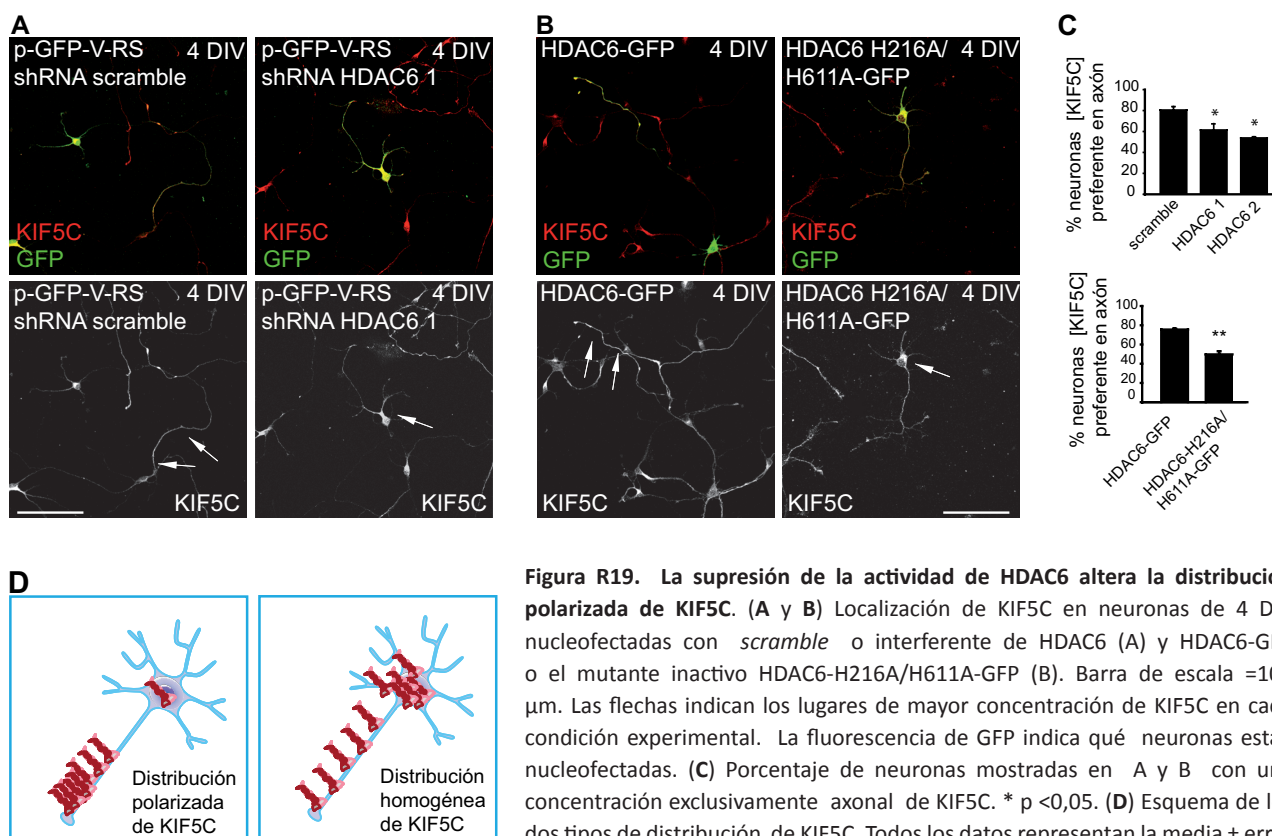


Figura R19. La supresión de la actividad de HDAC6 altera la distribución polarizada de KIF5C. (A y B) Localización de KIF5C en neuronas de 4 DIV nucleofectadas con *scramble* o interferente de HDAC6 (A) y HDAC6-GFP o el mutante inactivo HDAC6-H216A/H611A-GFP (B). Barra de escala = 100 μ m. Las flechas indican los lugares de mayor concentración de KIF5C en cada condición experimental. La fluorescencia de GFP indica qué neuronas están nucleofectadas. (C) Porcentaje de neuronas mostradas en A y B con una concentración exclusivamente axonal de KIF5C. * $p < 0,05$. (D) Esquema de los dos tipos de distribución de KIF5C. Todos los datos representan la media \pm error estándar de tres experimentos y al menos 100 neuronas por cada condición experimental.

7 EFECTO DE LA ACTIVIDAD DE GSK3 SOBRE LOS NIVELES DE ACETILACIÓN DE MICROTÚBULOS.

Recientemente, se ha descrito que GSK3 puede modular por fosforilación la actividad de HDAC6, de tal forma que su inhibición incrementa los niveles de acetilación de MT (Chen et al., 2010). Este mismo estudio confirma que ambas proteínas colocalizan y coinmunoprecipitan en neuronas de hipocampo. En líneas similares, otros trabajos han mostrado que la actividad de GSK3 puede regular los niveles de acetilación de α -tubulina en neuronas (Witte et al., 2008; Hammond et al., 2010). Así pues, para completar este primer bloque de objetivos decidimos evaluar el efecto de la inhibición de GSK3 sobre la acetilación de α -tubulina. Para ello tratamos neuronas de 2 DIV con un inhibidor específico de GSK3, inhibidor X (Kim et al., 2006), durante 24 horas y realizamos ensayos de *Western blot* e inmunocitoquímica para analizar los niveles de α -tubulina acetilada (fig. R20 A y B). En ambos ensayos, observamos un incremento significativo de α -tubulina acetilada como resultado de la inhibición de GSK3.

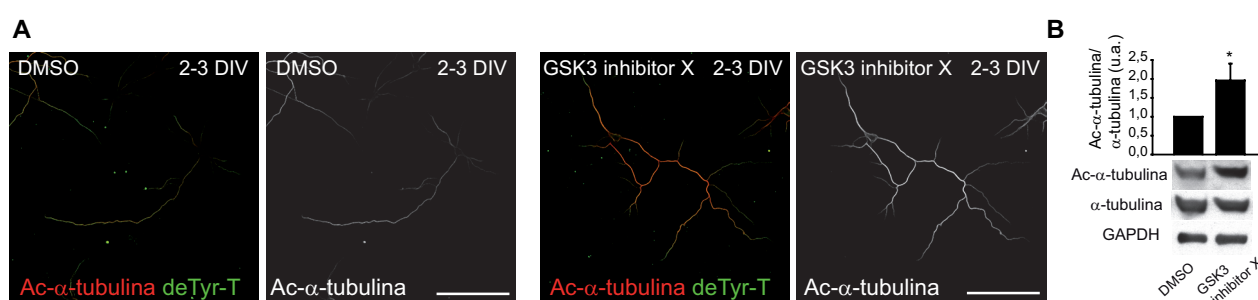


Figura R20. La inhibición de GSK3 aumenta los niveles de acetilación de MT en neuronas. (A) Neuronas de hipocampo de 3 DIV tratadas durante 24 horas con DMSO (vehículo) o inhibidor X de GSK3 (3 μ M) y teñidas con anticuerpos para Ac- α -tubulina o Detyr-T (tubulina detirosinada). (B) A partir de extractos totales de neuronas corticales se realizaron ensayos de *Western-blot* con anticuerpos dirigidos contra Ac- α -tubulina, α -tubulina y GAPDH. La gráfica muestra los niveles normalizados de Ac- α -tubulina/ α -tubulina (media \pm error estándar, N=3 experimentos independientes). * $p < 0,05$. Barra de escala = 100 μ m.

CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE β -CATENINA Y SU FOSFORILACIÓN POR GSK3 DURANTE EL DESARROLLO NEURONAL

1 LOCALIZACIÓN DE β -CATENINA Y β -CATENINA-P33/37/T41 DURANTE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO NEURONAL

Trabajos previos han demostrado que la fosforilación de β -catenina en residuos S33, S37 y T41 no sólo está involucrada en procesos de degradación. Por el contrario, se ha propuesto su relación con proteínas asociadas a MT en la vanguardia de zonas de crecimiento durante procesos de migración celular (Maher et al., 2009; Faux et al., 2010), así como se le han asignado nuevas funciones en polaridad celular y neurogénesis relacionadas con su localización centrosomal (Huang et al., 2007; Chilov et al., 2011). Estos hallazgos sugieren un posible papel de esta fosfoproteína en procesos de polaridad neuronal, ligado al citoesqueleto de MT.

1.1 β -catenina-pS33/S37/T41 se concentra en el axón en etapas iniciales de diferenciación *in vitro*

Nuestro primer objetivo fue estudiar la localización de β -catenina-pS33/37/T41 durante las primeras etapas de diferenciación neuronal *in vitro* en nuestro modelo de cultivo primario. Para ello, empleamos un anticuerpo específico que reconoce la proteína sólo cuando está fosforilada en los residuos serina 33 y 37 y treonina 41. Este anticuerpo ha sido empleado en trabajos anteriores y ha sido testado en ratones *Knock-out* de β -catenina (Chilov et al., 2011). Para poder cotejar mejor nuestras observaciones utilizamos un anticuerpo dirigido contra la región C-terminal de β -catenina. En primer lugar, analizamos estadios tempranos de diferenciación, estadio 2-3, y observamos que ambos anticuerpos reconocían regiones subcelulares distintas.

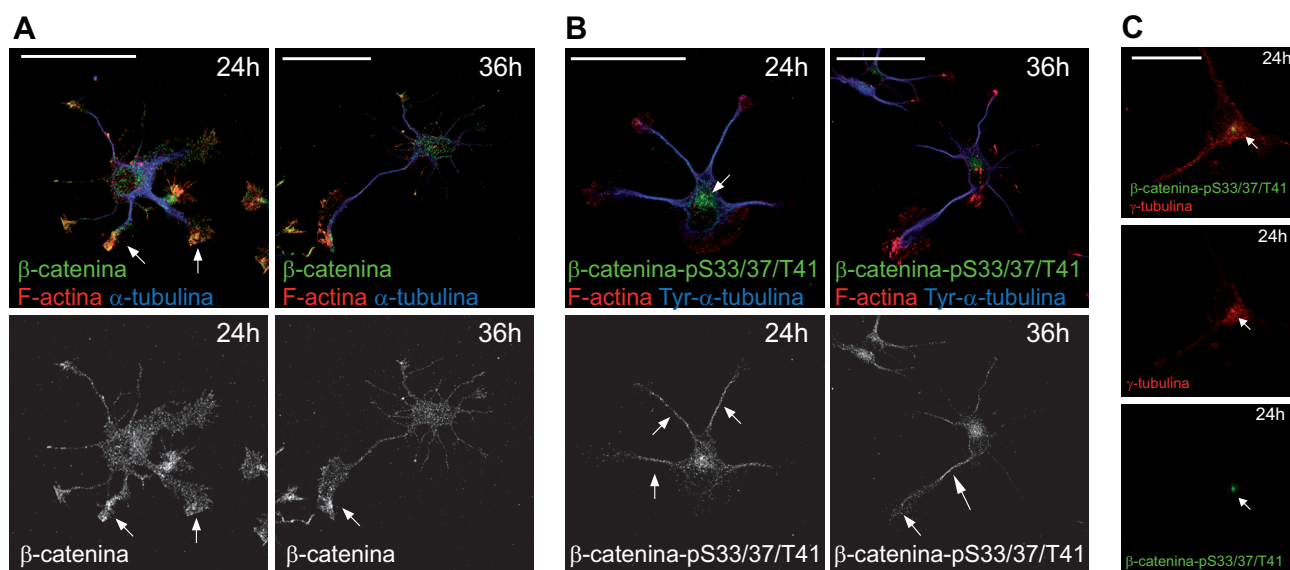


Figura R21. β -catenina-pS33/37/T41 se concentra en el axón naciente en estadios tempranos y está asociada a MT. (A) Neuronas de hipocampo de 24 y 36 horas de diferenciación *in vitro* se fijaron y tiñeron con faloidina-594, (rojo) y con anticuerpos para β -catenina (verde) y α -tubulina (azul). Los paneles inferiores muestran la tinción con β -catenina en escala de grises. Las flechas indican las zonas de máxima concentración de β -catenina en conos de crecimiento. **(B)** Neuronas de los mismos estadios de diferenciación descritos en A se tiñeron con faloidina-594 (F-actina, rojo) y con anticuerpos para β -catenina-pS33/37/T41 (verde) y tyr- α -tubulina (azul). Las flechas indican las regiones de mayor concentración de β -catenina -pS33/37/T41 asociada a MT en neuritas, centrosoma y en el axón naciente (imagen derecha). Las imágenes inferiores muestran el marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 en escala de grises. Barra de escala = 50 μ m. **(C)** Detalle del centrosoma de una neurona de hipocampo teñida con un marcador específico γ -tubulina (rojo) y con pS33/37/T41 - β -catenina (verde). Barra de escala = 25 μ m.

Como se muestra en la figura R21, a 24 horas de diferenciación observamos que el marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 se localiza en el soma, ocupando el territorio de tubulina tirosinada a lo largo de las neuritas, y además se concentra en el centrosoma, colocalizando con el marcador centrosomal γ -tubulina (fig. R21 C),

mientras que el anticuerpo de β -catenina reconoce principalmente los conos de crecimiento de las neuritas colocalizando con regiones de F-actina. Después de 36 horas *in vitro* (estadio 3) observamos que el marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 se concentra más selectivamente en el axón y presenta un marcaje puntiforme en el cono de crecimiento axonal. En este mismo estadio, el marcaje obtenido con el anticuerpo dirigido contra su análoga no fosforilada permite observar una tinción enriquecida sólo en el cono de crecimiento axonal (**fig. R21 A**). A medida que el axón continúa su elongación, 48 horas *in vitro*, el marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 se observa principalmente en las zonas más distales del axón (**fig. R22 B**), aunque se observa una señal de menor intensidad en el resto de neuritas. Este mismo patrón de localización se observó utilizando un segundo anticuerpo que reconoce la fosforilación de β -catenina en serinas 33 y 37. Esta diferencia de marcaje entre el anticuerpo dirigido contra la región C-terminal de β -catenina y los anticuerpos dirigidos contra la región N-terminal fosforilada de β -catenina podría explicarse por cambios conformacionales de la proteína e incompatibilidad estérica, tal y como proponen algunos estudios (Gottardi and Gumbiner, 2004; Ritco-Vonsovici et al., 2007; Mo et al., 2009).

Para confirmar estos resultados, corroboramos la especificidad del anticuerpo dirigido contra β -catenina-pS33/37/T41. Dado que estas fosforilaciones son consecuencia de la actividad de GSK3, empleamos de nuevo el inhibidor comercial X de GSK3. La inhibición de GSK3 a tiempos cortos redujo significativamente los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 observados mediante *Western-blot*, e incrementó los niveles de β -catenina (**fig. R22 A**). De forma similar, el tratamiento con inhibidor X durante las primeras 48 horas de cultivo resultó en una pérdida significativa de la expresión de β -catenina-pS33/37/T41 ligada a un aumento de la expresión de β -catenina (**fig. R22 B y C**), confirmando de nuevo la especificidad de los sitios fosforilados por GSK3. Como esperábamos, la exposición al inhibidor de GSK3 también tuvo un efecto significativo en la especificación axonal (Garrido et al., 2007).

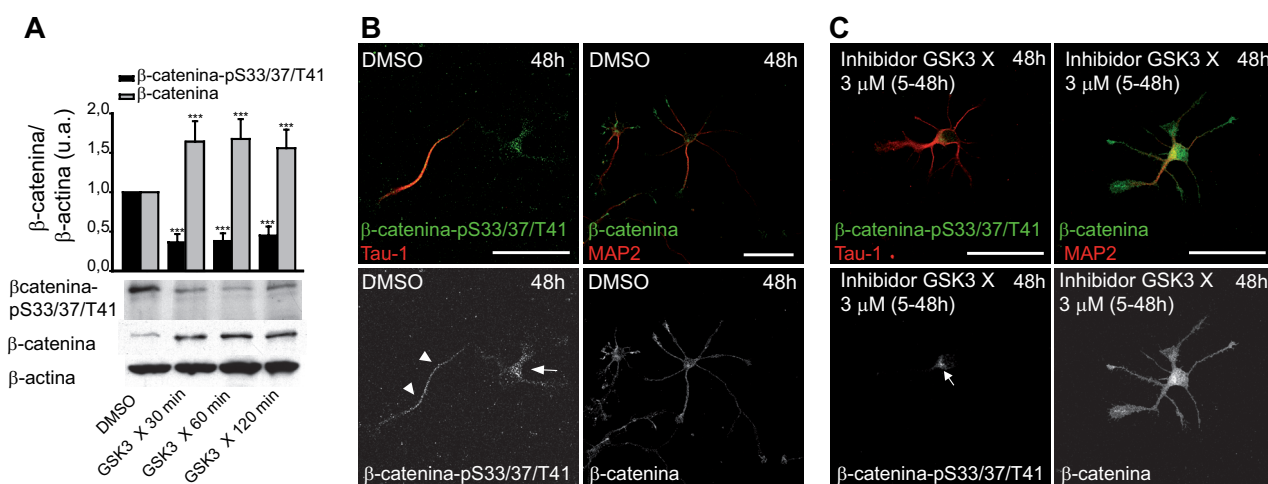


Figura R22. Los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 son dependientes de la actividad de GSK3. (A) A partir de extractos totales obtenidos de neuronas corticales de 2 DIV, previamente tratadas con inhibidor X de GSK3 a distintos tiempos, se realizaron ensayos de *Western-blot* con anticuerpos contra β -catenina-pS33/37/T41, β -catenina y β -actina. El gráfico representa la media y el error estándar de los niveles (en unidades arbitrarias, u.a.) de ambas proteínas normalizados (N=3 experimentos diferentes). *** $p < 0.001$. (B, C) Neuronas de hipocampo cultivadas durante 48 horas en presencia de DMSO (B) o de un inhibidor de la actividad de GSK3, inhibidor X (C) se tiñeron con anticuerpos para pS33/37T41- β -catenina o β -catenina (verde) y tau-1 (axón) o MAP2 (dendritas) (rojo). Las imágenes inferiores muestran el marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 y β -catenina en escala de grises. Las puntas de flecha señalan el axón y las flechas la posición del soma. Todas las imágenes fueron adquiridas con las mismas condiciones de intensidad de fluorescencia. Barra de escala = 50 μ m.

Todos estos resultados sugieren una localización subcelular diferenciada de β -catenina-pS33/37/T41, probablemente asociada con el citoesqueleto de MT y excluida del territorio de adhesión celular.

1.2 β -catenina-pS33/37/T41 se localiza de forma progresiva en el SIA *in vitro* e *in vivo*

Decidimos continuar analizando la expresión de β -catenina-pS33/37/T41 en estadios más tardíos del desarrollo y maduración axonal, de 3 a 21 DIV. Para ello empleamos marcadores de segmento inicial del axón y realizamos tinciones dobles con ankirina G y canales de sodio voltaje dependientes. Sorprendentemente a partir del tercer día *in vitro* un gran número de neuronas mostraron un marcaje intenso de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA, colocalizando con ambas proteínas (**fig. R23 A y B**). Como se indica en la figura R23 C, esta localización específica aumenta progresivamente a lo largo del desarrollo neuronal, donde el porcentaje de neuronas con una tinción positiva para β -catenina-pS33/37/T41 se incrementa desde un $43.2 \pm 7.10\%$ a 3 DIV hasta un $81.95 \pm 1.15\%$ en neuronas de 7 DIV, y se mantiene en neuronas más maduras (21 DIV) (**fig. R23 D**). Además, en neuronas maduras detectamos también un marcaje puntiforme en dendritas (**fig. R23 D**). En paralelo, examinamos la distribución subcelular de β -catenina y, al margen de una fuerte tinción en dendritas y axón, no encontramos una concentración similar en el SIA, al menos a niveles tan elevados como los de su análoga fosforilada. Comprobamos la pérdida de marcaje en los ensayos de inmunocitoquímica cuando el anticuerpo dirigido contra β -catenina-pS33/37/T41 fue preincubado con el fosfopéptido utilizado para generar el anticuerpo. Como esperábamos, el bloqueo del anticuerpo con su fosfopéptido resultó en una ausencia de marcaje en los ensayos de inmunocitoquímica (**fig. R23 F**).

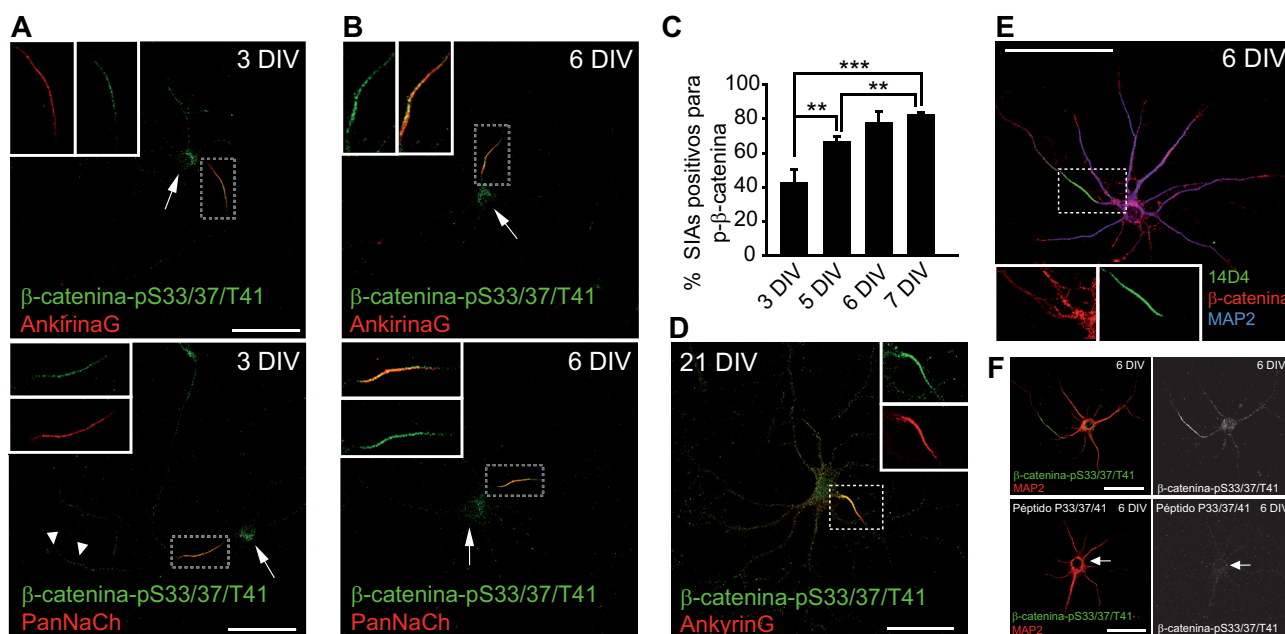


Figura R23. β -catenina-pS33/37/T41 se concentra en el SIA a partir del tercer día de diferenciación *in vitro*. (A, B) Neuronas de hipocampo de 3 DIV (A) y 6 DIV (B) fueron teñidas con los marcadores ankirina G y PanNaCh (rojo) y pS33/37/T41- β -catenina (verde). Las puntas de flecha señalan los conos de crecimiento donde se detecta la presencia de β -catenina-pS33/37/T41 (A, imagen inferior). (C) Porcentaje de neuronas que presentan β -catenina-pS33/37/T41 concentrada en el SIA durante diferentes estadios de diferenciación, en segmentos iniciales positivos para el marcador ankirina G. La gráfica representa la media \pm error estándar de N=3 experimentos independientes (500 neuronas/experimento). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (D) Neuronas de hipocampo de 21 DIV teñidas con anticuerpos contra PanNaCh (rojo) y pS33/37/T41- β -catenina (verde). (E) Triple inmunotinción con β -catenina (rojo), 14D4 (verde) y MAP2 (azul) en neuronas de 6 DIV. (F) Control interno del anticuerpo pS33/37/T41- β -catenina. Neuronas de hipocampo de 6 DIV fueron teñidas con el anticuerpo pS33/37/T41- β -catenina preincubado con el péptido bloqueante P33/37/41- β -catenina. Las flechas indican la posición del soma. Los recuadros muestran una ampliación del SIA. Barra de escala = 50 μ m.

Por otro lado, al analizar la intensidad de fluorescencia de β -catenina-pS33/37/T41 a lo largo de la neurona, confirmamos que β -catenina-pS33/37/T41 cambiaba progresivamente su localización preferente hacia el segmento inicial del axón (**fig. R24**). Mientras que en estadios tempranos es más aparente su concentración en el axón distal y en soma, donde el marcaje en centrosoma es evidente, en estadios posteriores su máxima concentración la encontramos en el SIA, y en menor grado en las dendritas de neuronas muy desarrolladas.

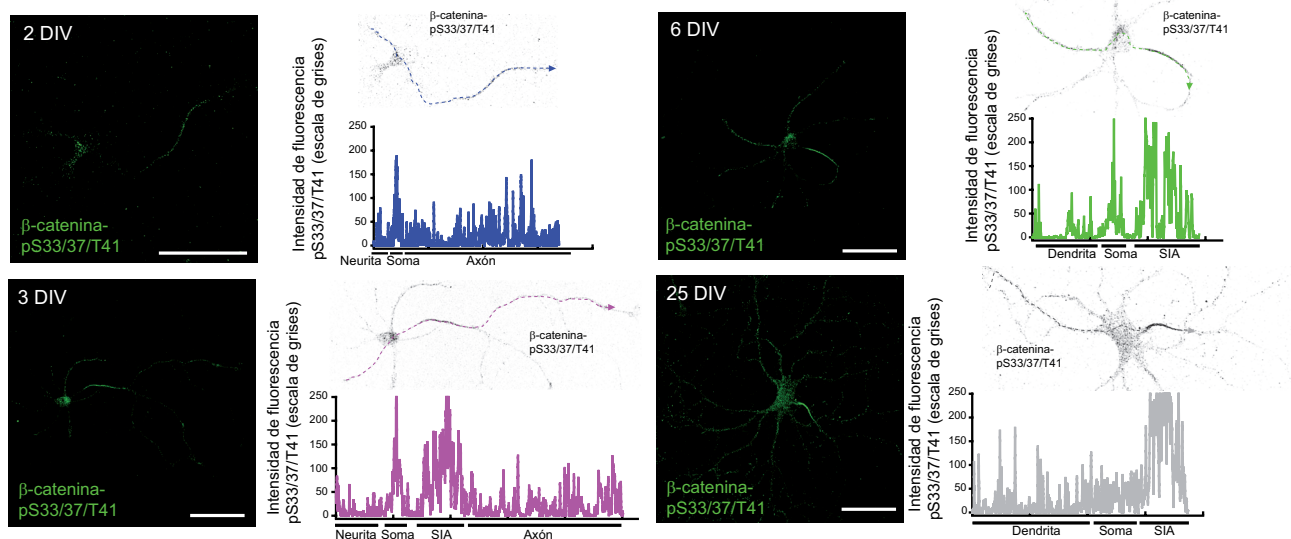


Figura R24. β -catenina-pS33/37/T41 se concentra en el SIA y disminuye su concentración en centrosoma en estadios avanzados de desarrollo. Neuronas de hipocampo de diferentes tiempos se fijaron y se tiñeron con el anticuerpo que reconoce pS33/37/T41- β -catenina (verde). Las gráficas situadas a la izquierda de cada imagen muestran la intensidad de fluorescencia (escala de grises) de β -catenina-pS33/37/T41 a lo largo de las zonas señaladas en la imagen superior. Barra de escala = 50 μ m.

Para confirmar plenamente la especificidad de nuestro anticuerpo dirigido contra β -catenina-pS33/37/T41, analizamos sus niveles de expresión en ausencia de β -catenina. Debido al éxito relativamente bajo de la transfección por nucleofección, comprobamos en primer lugar que dos shRNA de interferencia diferentes de β -catenina reducían la expresión endógena de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 en células N2a

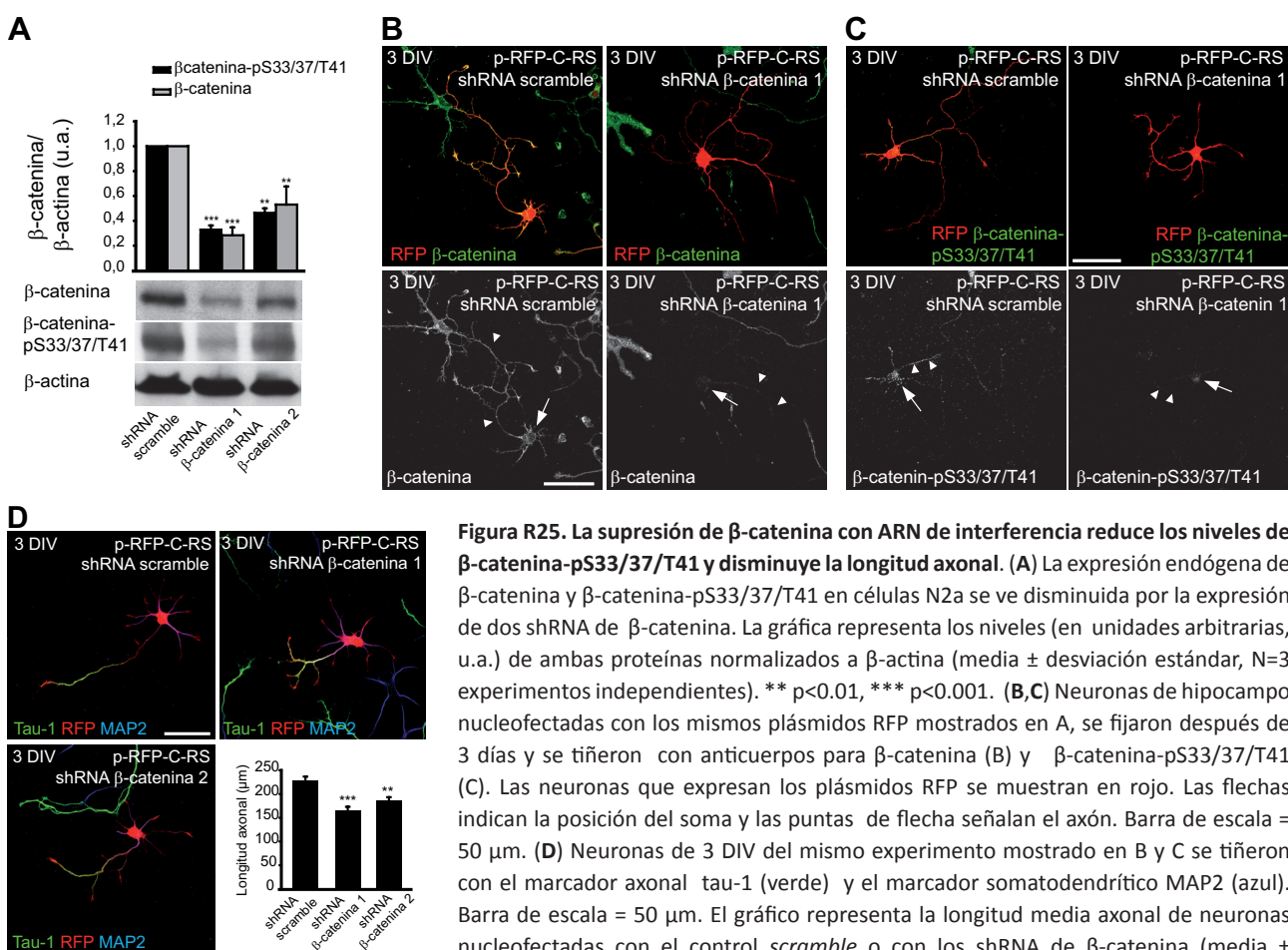


Figura R25. La supresión de β -catenina con ARN de interferencia reduce los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 y disminuye la longitud axonal. (A) La expresión endógena de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 en células N2a se ve disminuida por la expresión de dos shRNA de β -catenina. La gráfica representa los niveles (en unidades arbitrarias, u.a.) de ambas proteínas normalizados a β -actina (media \pm desviación estándar, N=3 experimentos independientes). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B,C) Neuronas de hipocampo nucleofectadas con los mismos plásmidos RFP mostrados en A, se fijaron después de 3 días y se tiñeron con anticuerpos para β -catenina (B) y β -catenina-pS33/37/T41 (C). Las neuronas que expresan los plásmidos RFP se muestran en rojo. Las flechas indican la posición del soma y las puntas de flecha señalan el axón. Barra de escala = 50 μ m. (D) Neuronas de 3 DIV del mismo experimento mostrado en B y C se tiñeron con el marcador axonal tau-1 (verde) y el marcador somatodendrítico MAP2 (azul). Barra de escala = 50 μ m. El gráfico representa la longitud media axonal de neuronas nucleofectadas con el control *scramble* o con los shRNA de β -catenina (media \pm desviación estándar; N=3 experimentos independientes; 50 neuronas/condición experimental de cada experimento). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

(fig. R25 A). La expresión del interferente de β -catenina shRNA 1 disminuyó la expresión endógena de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 aproximadamente en un 70 % (comparado con el valor control), mientras que el shRNA2 redujo la expresión de ambas proteínas en un 50 %. A continuación confirmamos que la expresión de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 en neuronas de hipocampo de 3 DIV, nucleofectadas con los mismos interferentes, se veía afectada de la misma manera. Como se aprecia en la figura R25, la expresión del interferente 1 reduce drásticamente el marcaje de β -catenina de forma global en toda la neurona (fig. R25 B) así como de β -catenina-pS33/37/T41 con una ausencia total de marcaje en el SIA (fig. R25 C). De forma similar el interferente 2 también redujo los niveles de ambos marcadores. Dado que la especificación axonal es un requisito previo a la formación del SIA, y a fin de excluir posibles falsos negativos, se evaluaron los axones de neuronas nucleofectadas utilizando el marcador axonal tau-1. Conforme a trabajos publicados anteriormente (David et al., 2008) la supresión de β -catenina no comprometió la especificación axonal, pero sí redujo la longitud axonal de neuronas de 3 DIV. Mientras que las neuronas nucleofectadas con el plásmido shRNA *scramble* desarrollaron axones de $227.75 \pm 8.92 \mu\text{m}$, los axones de neuronas nucleofectadas con los interferentes de β -catenina 1 ó 2 alcanzaron una longitud de $165.58 \pm 7.55 \mu\text{m}$ y $186.28 \pm 7.09 \mu\text{m}$, respectivamente (fig. R25 D). La elongación axonal posterior no fue comprometida por la interferencia de β -catenina, tal y como se observó en neuronas de 6 DIV, las cuales mostraron una reducción clara de la expresión de ambas proteínas (fig. R26).

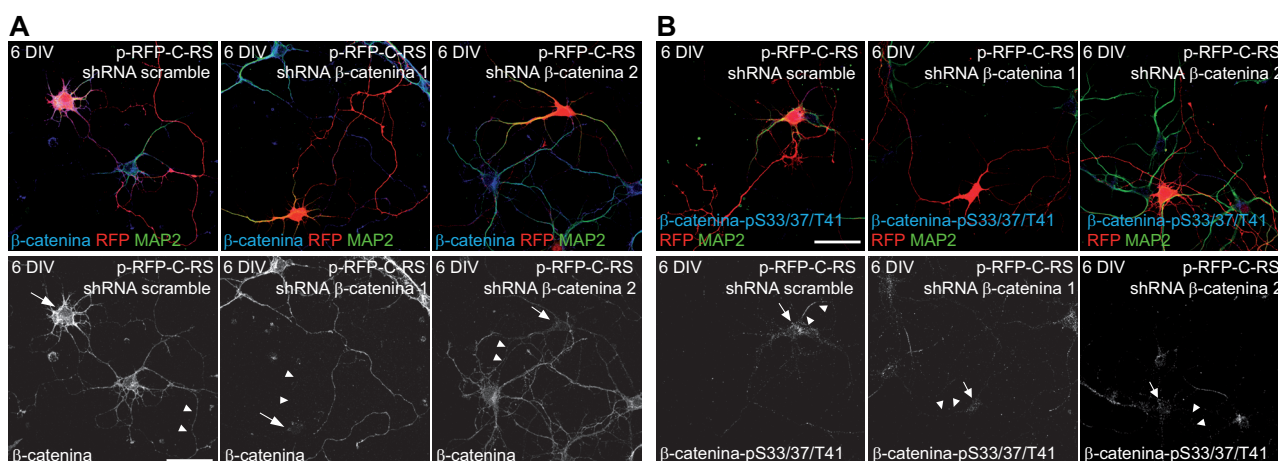


Figura R26. La supresión de β -catenina con ARN de interferencia reduce los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA. (A, B) Neuronas de hipocampo nucleofectadas con los plásmidos RFP que expresan el ARN de interferencia de β -catenina o el control *scramble*, se fijaron después de 6 días y se tiñeron con anticuerpos para β -catenina (A) y β -catenina-pS33/37/T41 (B) y con el marcador somatodendrítico MAP2. Las neuronas que expresan los plásmidos RFP se muestran en rojo. Las flechas indican la posición del soma y las puntas de flecha señalan el axón en A y la posición del segmento inicial del axón en B. Barra de escala = 50 μm .

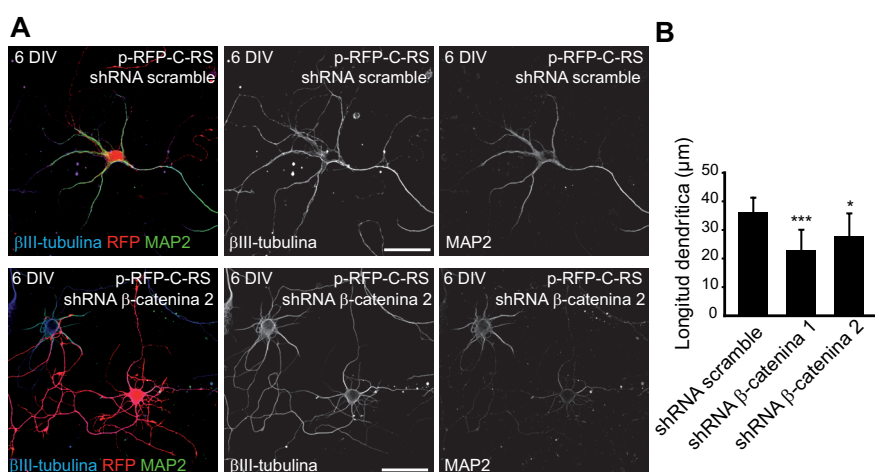


Figura R27. La supresión de β -catenina con ARN de interferencia reduce la longitud dendrítica. (A) Neuronas de hipocampo nucleofectadas con los plásmidos empleados en la figura R26, se fijaron después de 6 días y se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra MAP2 (verde) y β III-tubulina (azul). Barra de escala = 50 μm . **(B)** Longitud dendrítica de neuronas nucleofectadas. La gráfica representa la media \pm desviación estándar de N=3 experimentos independientes (20 neuronas/ condición experimental de cada experimento). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

Conociendo la función de β -catenina en procesos de maduración dendrítica (Yu and Malenka, 2003) examinamos con mayor detalle las neuronas nucleofectadas de 6 DIV, dado que entre 3 y 7 días se establece el punto crítico de maduración dendrítica (Baas et al., 1989), y realizamos una tinción doble para MAP2 y β III-tubulina. Como se aprecia en la figura R27, la supresión de β -catenina disminuye significativamente la longitud dendrítica (**fig. R27 B**) y la expresión de MAP2 (**fig. R27 A**), lo cual refleja una afectación del desarrollo dendrítico.

Una vez confirmado *in vitro* la acumulación progresiva de β -catenina-pS33/37/T41 en el segmento inicial, comprobamos su localización en el segmento inicial del axón durante el desarrollo neuronal *in vivo*. Para ello, analizamos la expresión de β -catenina-pS33/37/T41 en secciones de cerebro de diferentes etapas de desarrollo (E18-P12), identificando el segmento inicial del axón mediante el marcaje de ankirina G (**fig. R28**). Al mismo tiempo, realizamos una tinción regresiva con Giemsa para identificar mejor las diferentes regiones

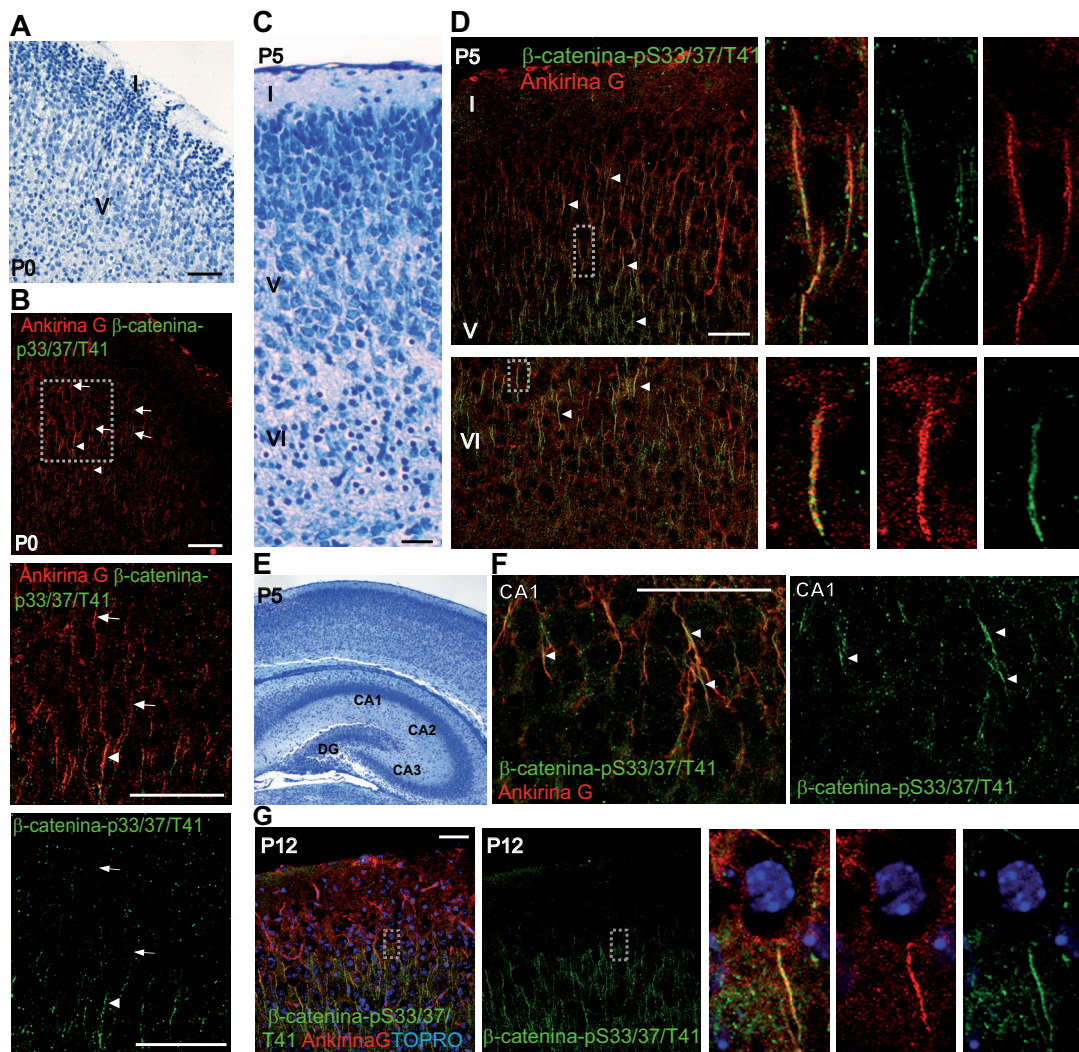


Figura R28. Concentración progresiva de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA *in vivo*. Doble inmunotinción para β -catenina-pS33/37/T41 (verde) y ankirina G (rojo) de secciones del neocórtex parietal de cerebros de ratón de P0 y P5 (**B,D**) y del hipocampo de ratón de P5 (**F**). Las tinciones con Giemsa muestran las diferentes capas corticales y subcorticales de P0 (**A**) y P5 (**C**) y las distintas regiones del hipocampo (**E**). Las flechas señalan los segmentos iniciales marcados sólo con ankirina G y las puntas de flecha indican los segmentos iniciales marcados con ankirina G y β -catenina-pS33/37/T41. Los recuadros muestran una visión ampliada de ambas proteínas en el SIA. (**G**) Imagen de una sección cortical de cerebro de ratón de P12 teñido adicionalmente con TOPRO para identificar los núcleos celulares. Los recuadros muestran una visión ampliada de ambas proteínas en el SIA. Barra de escala = 50 μ m.

del cerebro. En secciones de cerebros embrionarios E18 no detectamos ningún marcaje de β -catenina-pS33/37/T41. Sin embargo, en secciones de cerebros postnatales P0 observamos una ligera tinción en segmentos iniciales dispersos, en neuronas de la capa V de la corteza cerebral parietal (**fig. R28 A y B**). En secciones de cerebros más maduros (P5) observamos una tinción positiva de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA, colocalizada con ankirina G, desde las capas corticales superficiales a la capa VI (**fig. R28 C y D**), así como en las regiones CA1-CA3 del hipocampo (**fig. R28 E y F**). Finalmente, en una etapa postnatal más tardía, P12, β -catenina-pS33/37/T41 se detectó en el segmento inicial de la mayoría de las neuronas corticales (**fig. R28 G**). Estos resultados demuestran por lo tanto, un enriquecimiento progresivo de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA durante el desarrollo y maduración neuronal.

2 MECANISMOS DE LOCALIZACIÓN DE β -CATENINA-PS33/37/T41 EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Una vez confirmada la localización preferente de β -catenina-pS33/37/T41 en el segmento inicial del axón, pasamos a identificar los mecanismos por los cuáles se localiza en el SIA, centrándonos en su posible relación con el citoesqueleto del segmento inicial del axón y proteínas asociadas a β -catenina o proteínas estructurales del segmento inicial del axón.

2.1 β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA no está asociada con APC y es independiente de la actividad del proteasoma.

Dado que se ha postulado que β -catenina-pS33/37/T41 es degradada por el proteasoma, en primer lugar estudiamos el comportamiento de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA después de alterar la actividad del proteasoma. Para ello, tratamos neuronas de hipocampo de 5 DIV con un inhibidor específico de proteasoma, MG132 (50 nM), durante 24 horas. Como se aprecia en la figura R29 la exposición al inhibidor aumentó significativamente los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 en el soma, pero no alteró ni su localización ni sus niveles en el segmento inicial del axón.

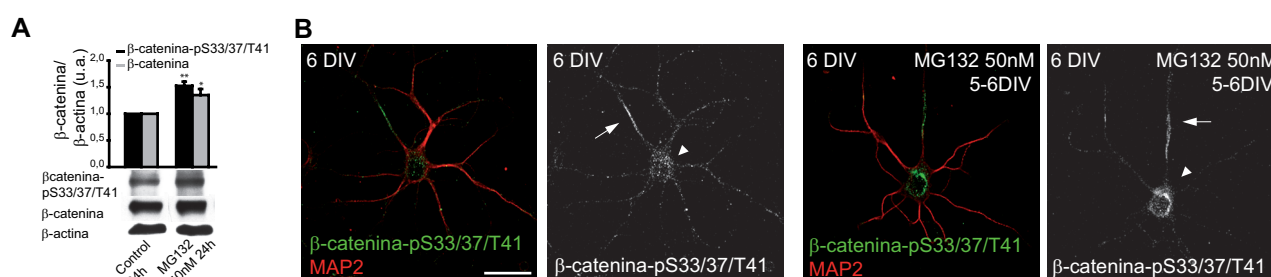


Figura R29. La inhibición del proteasoma no altera la expresión de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA pero sí aumenta su concentración en soma. (A) Expresión de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 en neuronas corticales, tratadas o no con el inhibidor de proteasoma MG132 50nM durante 24 horas. La gráfica representa los niveles (en unidades arbitrarias, u.a.) de ambas proteínas normalizados a β -actina (media \pm error estándar, N=3 experimentos independientes). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. (B) Neuronas de hipocampo tratadas con el inhibidor MG132 (50 nM) de 5 a 6 DIV y teñidas con anticuerpos anti-pS33/37/T41- β -catenina y anti-MAP2. Barra de escala = 25 μ m.

Con el fin de identificar qué proteínas podían estar asociadas a β -catenina-pS33/37/T41 en el segmento inicial, nuestro siguiente objetivo fue evaluar la localización de N-cadherina y APC, proteínas que interaccionan con β -catenina y regulan procesos de adhesión celular o la dinámica de MT, respectivamente. Además, APC es una proteína clave para el proceso de degradación de β -catenina-pS33/37/T41 (Su et al., 2008). En primer lugar, analizamos la localización subcelular de ambas proteínas en diferentes etapas del desarrollo neuronal. Como se muestra en la figura R30, APC se detecta principalmente a lo largo del axón compartiendo el mismo patrón de distribución que β -catenina-pS33/37/T41 en neuronas de 2 DIV. Por el contrario, N-cadherina

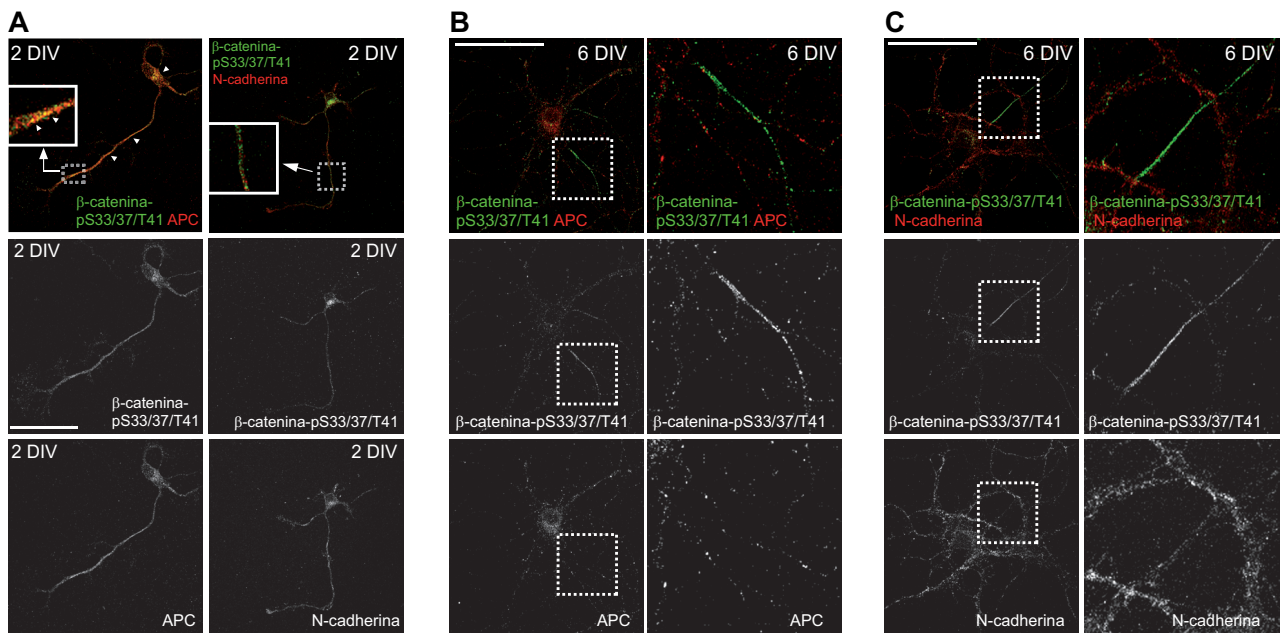


Figura R30. β -catenina fosforilada por GSK3 se asocia con APC en el axón pero no en el segmento inicial del axón. Neuronas de hipocampo cultivadas durante 2 DIV (**A**) y 6 DIV (**B y C**), fijadas y teñidas con anticuerpos para β -catenina-pS33/37/T41 (verde) y APC o N-cadherina (rojo). Nótese que β -catenina-pS33/37/T41 muestra la misma localización que APC a lo largo de MT axonales a 2 DIV, mientras que ni APC ni N-cadherina están localizados en el SIA de neuronas de 6 DIV. Los recuadros muestran una imagen ampliada del SIA. Barra de escala = 50 μ m.

presenta un patrón diferente de localización (**fig. R30 A**). Analizando neuronas más maduras, ni APC ni N-cadherina se concentraron en el SIA (**fig. R30 B y C**). Estos datos sugieren que β -catenina-pS33/37/T41 posee propiedades diferentes en SIA y no parece estar bajo la regulación del proteasoma en esta región.

2.2 La localización en SIA de β -catenina-pS33/37/T41 es dependiente de la expresión de Ankirina G

La agrupación y anclaje de la mayoría de proteínas que conforman el SIA dependen de la localización previa de ankirina G (Rasband, 2010). En este sentido, varios trabajos han demostrado que la pérdida de ankirina G

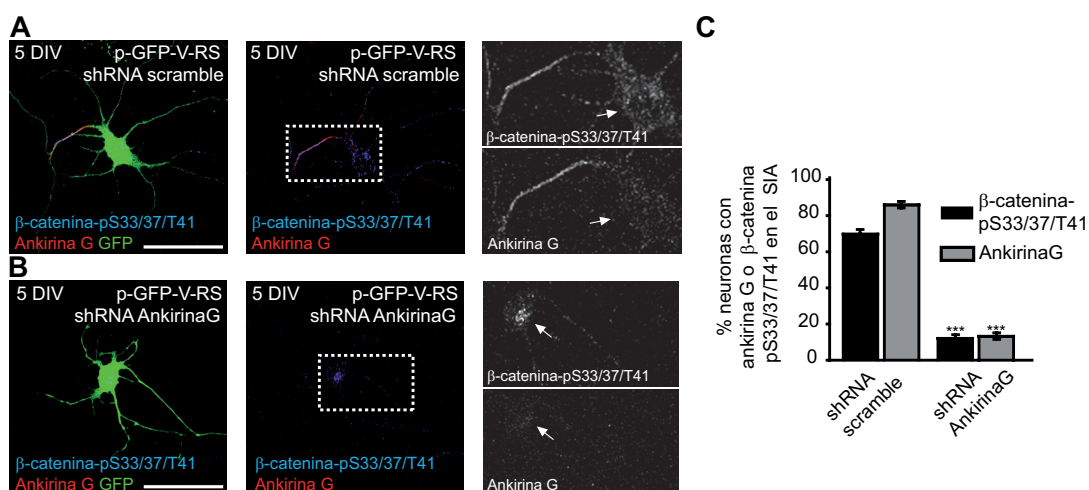


Figura R31. La expresión de ankirina G es necesaria para la localización de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA. (**A, B**) Neuronas de hipocampo de 5 DIV nucleofectadas con plásmidos GFP que expresan shRNA *scramble* (**A**) o un shRNA de ankirina G (**B**), inmunoteñidas con anticuerpos anti-ankirina G (rojo) y anti-pS33/37/T41- β -catenina (verde). Los paneles de la derecha muestran una visión ampliada del SIA donde se aprecia una acumulación de β -catenina-pS33/37/T41 en el soma de neuronas nucleofectadas con el interferente de ankirina G. Barra de escala = 50 μ m. (**C**) El gráfico representa el porcentaje de neuronas con ankirina G (barras negras) o β -catenina-pS33/37/T41 (barras grises) presente en el SIA, (media \pm error estándar; N=3 experimentos independientes; 50 neuronas/condición experimental de cada experimento). *** $p < 0.001$.

puede alterar la localización de canales de sodio dependientes de voltaje (Zhou et al., 1998) o β -IV-espectrina (Berghs et al., 2000). Así pues, como siguiente objetivo nos planteamos averiguar si la localización de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA era dependiente de la expresión de ankirina G.

Para lograr este propósito nucleofectamos neuronas de hipocampo con un interferente específico de ankirina G, previamente caracterizado en nuestro laboratorio (Sanchez-Ponce et al., 2011a). Las neuronas se mantuvieron en cultivo durante 5 días, tras lo cual observamos que el marcaje de ankirina G era detectable en el SIA en un 85.93 ± 1.61 % de las neuronas nucleofectadas con el shRNA *scramble* (control). En estas mismas neuronas observamos marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA en un 69.75 ± 2.08 % de las neuronas (**fig. R31 A y C**). Por el contrario, las neuronas nucleofectadas con shRNA dirigido contra ankirina G perdieron la localización de ankirina G y β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA en un 86.81 ± 3.53 % y 87.96 ± 1.58 %, respectivamente (**fig. R31 B y C**). Curiosamente, en el 30 % de estas neuronas se detectó un aumento de la concentración de β -catenina-pS33/37/T41 en el soma (**fig. R31 B**, ampliación en el panel derecho). En vista de estos resultados podemos concluir que la expresión de ankirina G es necesaria para la localización específica de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA.

2.3 β -catenina-pS33/37/T41 comparte las mismas características de unión a SIA que otras proteínas del segmento inicial y depende la integridad de los microtúbulos

Para comprender mejor la naturaleza del anclaje de β -catenina-pS33/37/T41 en el segmento inicial del axón, nos propusimos estudiar etapas más avanzadas de desarrollo *in vitro*. A 15 y 21 DIV, donde las neuronas muestran un árbol dendrítico robusto y bien formado, β -catenina-pS33/37/T41 aún se encuentra localizada

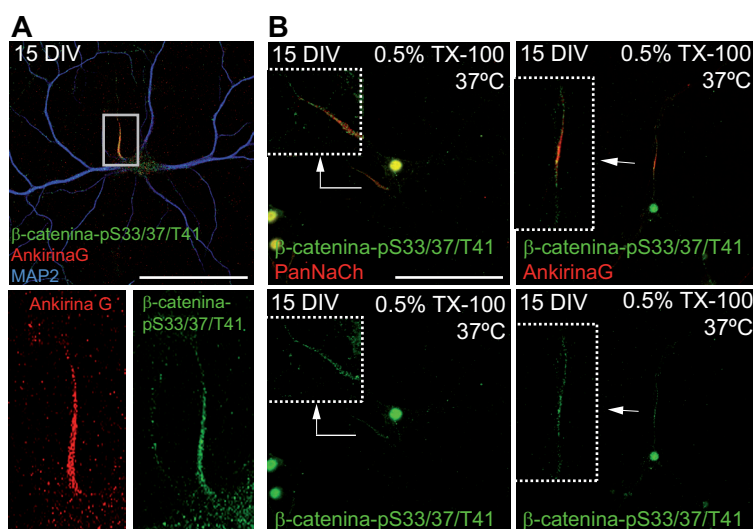


Figura R32. β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA es resistente a la extracción con detergentes. (A) Neuronas de hipocampo de 15 DIV teñidas con anticuerpos dirigidos contra ankirina G (rojo) y β -catenina-pS33/37/T41 (verde). Las imágenes inferiores muestran una región ampliada del SIA. (B) Neuronas de hipocampo de 15 DIV tratadas con tampón de citoesqueleto con Tritón X-100 durante 10 minutos a 37°C. Después de la fijación las neuronas se tiñeron con anticuerpos dirigidos contra PanNaCh y β -catenina-pS33/37/T41 (izquierda) o ankirina G y β -catenina-pS33/37/T41 (derecha). Los recuadros muestran una vista ampliada del SIA. Barra de escala 100 μ m.

en SIA (**fig. R32 A**, **fig. R23 D**). Dado que las proteínas firmemente ancladas en el SIA son insolubles en detergentes no iónicos, se realizó una extracción con Tritón X-100 en neuronas de 15 DIV durante 10 minutos a 37°C, antes de la fijación. Como esperábamos, el marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 quedó restringido al SIA compartiendo localización con canales de sodio y ankirina G (**fig. R32 B**).

Para investigar la posible relación de β -catenina-pS33/37/T41 con los MT del segmento inicial, neuronas de 7 DIV fueron tratadas con nocodazol o taxol 10 nM durante 3 días *in vitro*. Con el fin de evaluar los efectos del nocodazol sobre otras proteínas asociadas a MT en el SIA, utilizamos un anticuerpo contra EB1, proteína especialmente concentrada en los MT del SIA (Nakata and Hirokawa, 2003; Leterrier et al., 2011b). La desestabilización de MT inducida por nocodazol redujo los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 y el marcaje

de EB1 en el SIA, mientras que el tratamiento con taxol eliminó la señal de EB1 en SIA pero no así el marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 (**fig. R33 A**). Por otro lado, la red de MT ligada al SIA exhibe un alto contenido en modificaciones posttraduccionales y un cambio en la tasa de acetilación de MT puede alterar la distribución de proteínas en el SIA (resultados de la sección anterior). Para determinar si un aumento de acetilación podría afectar a la localización de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA, neuronas de 15 DIV fueron tratadas con TSA durante 48 horas y, después de la extracción con Tritón X-100, se fijaron y tiñeron con anticuerpos para β -catenina-pS33/37/T41 y Ac- α -tubulina. Como se muestra en la figura R33 B, la expresión de ambas

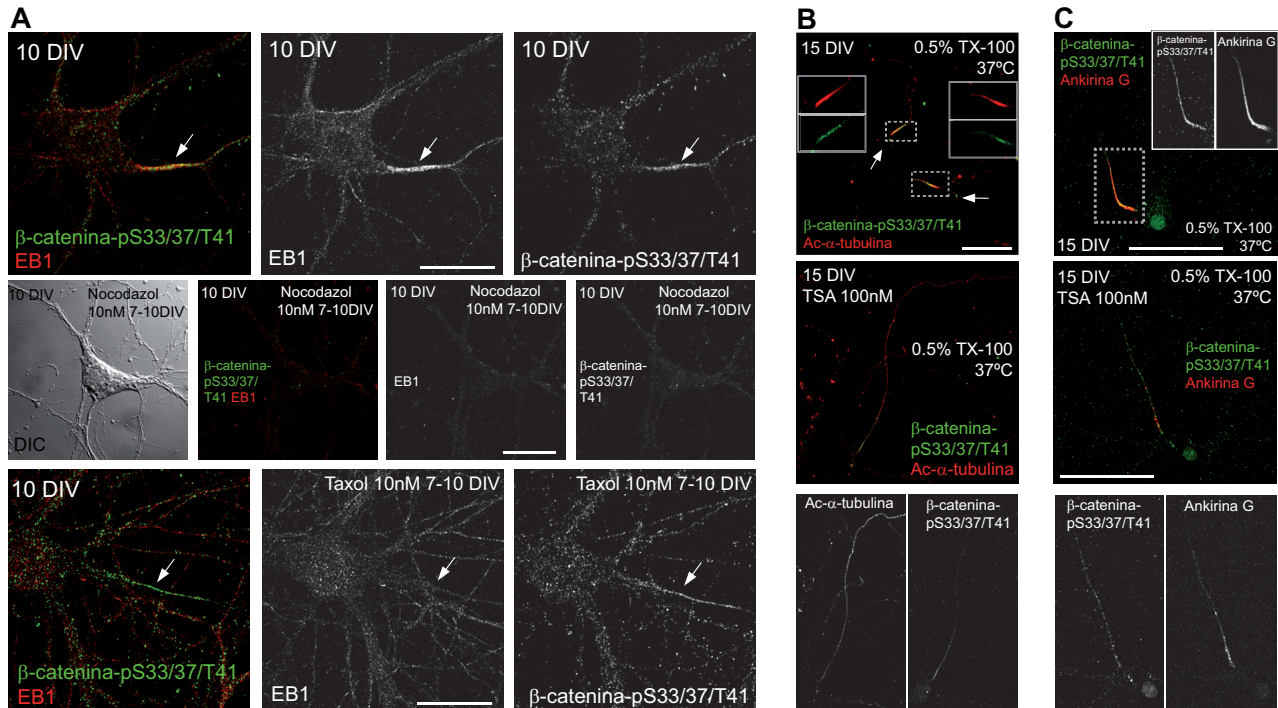


Figura R33. La localización en el SIA de β -catenina -pS33/37/T41 depende de la integridad de sus MT asociados. (A) Neuronas de hipocampo de 10 DIV cultivadas en presencia o ausencia de nocodazol (10 nM) de 7 a 10 DIV. Antes de su fijación con PFA 4%, las neuronas se mantuvieron durante 5 minutos en metanol frío (-20°C) y luego se tiñeron con anticuerpos para EB1 (rojo) y β -catenina-pS33/37/T41 (verde). La imagen con DIC se muestra para identificar la posición del soma. **(B)** Tinción con marcadores Ac- α -tubulina y β -catenina-pS33/37/T41 de neuronas de 15 DIV control (imagen superior) o tratadas con TSA 100 nM durante 48 horas (imagen inferior) y extraídas con Tritón X-100 0.5 %. Las flechas indican la posición del soma. **(C)** Las neuronas mostradas en B pero con los marcadores ankirina G (rojo) y β -catenina-pS33/37/T41 (verde), donde se muestra una pérdida notable de ankirina G en SIA. Barra de escala 20 μ m en A y 50 μ m en B y C.

proteínas se restringe al segmento inicial en neuronas control. Por el contrario el tratamiento con TSA provoca un marcaje difuso de Ac- α -tubulina a lo largo del axón y una pérdida de concentración específica de β -catenina-pS33/37/T41 (**fig. R33 B**), que coincide con un menor anclaje de ankirina G en el SIA (**fig. R33 C**). En conjunto, estos resultados reflejan una relación de β -catenina-pS33/37/T41 con MT exhibiendo las mismas propiedades que otras proteínas ancladas al SIA.

2.4 La quinasa GSK3 se localiza en el segmento inicial del axón y es resistente a la extracción con detergentes

Dada la elevada concentración de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA, nuestro siguiente objetivo fue evaluar si la quinasa GSK3 estaba asociada igualmente a la estructura del segmento inicial del axón. Para ello evaluamos primero su presencia en neuronas maduras de 18 DIV antes y después de realizar una extracción con Tritón X-100. Como se muestra en la figura R34, GSK3 se localiza de forma ubicua en toda la neurona (**fig. R34 A**). Sin embargo, después de realizar una extracción con detergentes GSK3, al igual que la mayoría de proteínas asociadas al SIA, queda retenida en esta estructura, colocalizando con el marcador 14D4 (**fig. R34 B**).

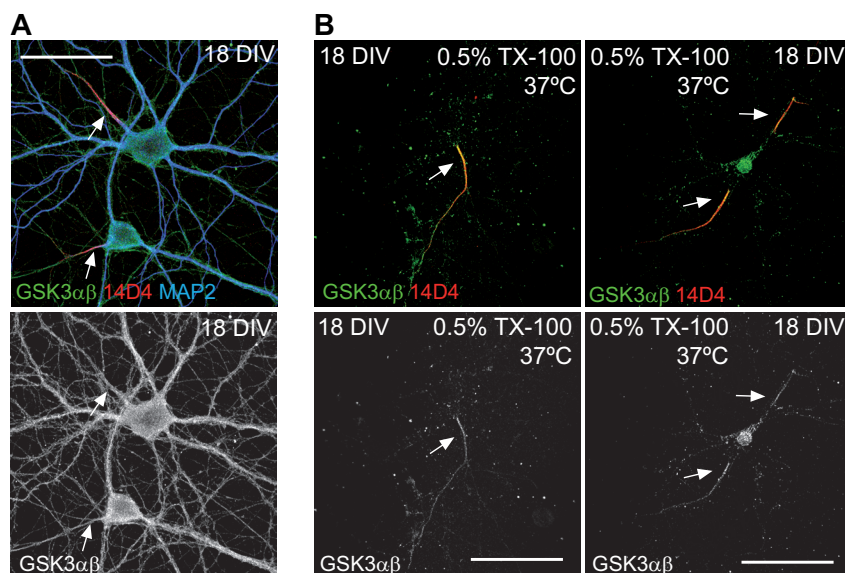


Figura R34. GSK3αβ es resistente a la extracción con detergentes en el SIA. Neuronas de hipocampo de 18 DIV teñidas con anticuerpos dirigidos contra 14D4 (rojo), GSK3αβ (verde) y MAP2 (azul), antes (A) y después de una extracción con Tritón X-100 0.5 % (B). Las flechas señalan las proteínas asociadas al segmento inicial después de la extracción. Barra de escala = 50 μm.

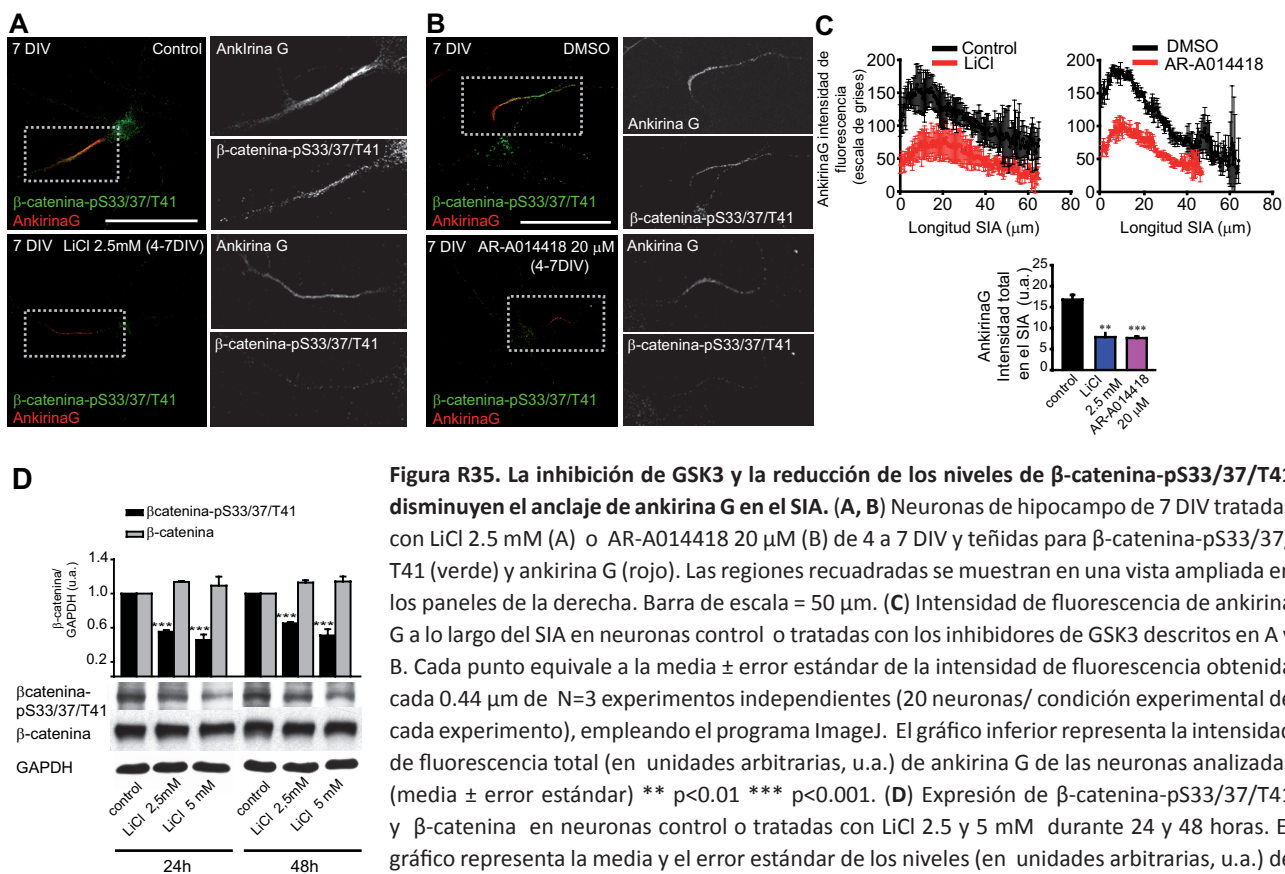
Por lo tanto, GSK3 está asociada a la estructura del SIA, lo que implicaría un mejor mantenimiento de los niveles de β-catenina-pS33/37/T41 en este dominio.

3 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN DE GSK3 Y LA SUPRESIÓN DE β-CATENINA EN PROCESOS DE EXCITABILIDAD NEURONAL

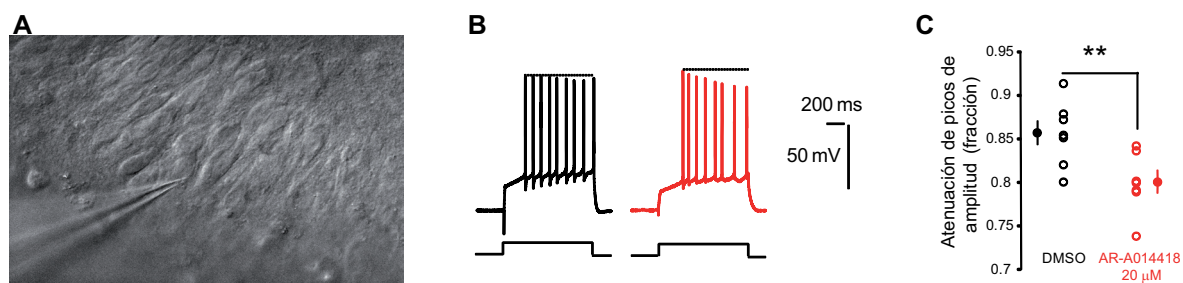
Los resultados anteriores nos han permitido identificar y caracterizar la localización de una nueva proteína en el segmento inicial, β-catenina fosforilada por GSK3 en S33/37/T41. Esta proteína se acumula en este dominio a lo largo del desarrollo neuronal y comparte las mismas características y dependencia de ankirina G que otras proteínas caracterizadas en el SIA. Teniendo en cuenta su posicionamiento más tardío, nos planteamos la hipótesis de una función de β-catenina-pS33/37/T41 en la maduración funcional del segmento inicial del axón. Para abordar esta cuestión, analizamos la integridad y composición del SIA en ausencia de β-catenina-pS33/37/T41 empleando dos aproximaciones experimentales: la inhibición de la quinasa GSK3 y la supresión de β-catenina por medio de un sistema *knock-down*.

3.1 La inhibición de la fosforilación de β-catenina en S33/37/T41 reduce el agrupamiento de ankirina G y modifica las propiedades electrofisiológicas del SIA

Para la inhibición de GSK3 escogimos dos inhibidores: cloruro de litio (LiCl) como inhibidor clásico de GSK3 (Klein and Melton, 1996) y AR-A014418, un inhibidor selectivo de GSK3 probado contra otras 52 quinasas (Bhat et al., 2003). El tratamiento con litio 2.5 mM durante 24 ó 48 horas en cultivos corticales de alta densidad reveló una reducción en la fosforilación de β-catenina del 55 ó 65 %, respectivamente (**fig. R35 D**). Dado que el enriquecimiento de β-catenina-pS33/37/T41 en el SIA se inicia después de tres días en cultivo (**fig. R23**), se trataron neuronas de hipocampo de 4 DIV con LiCl (2.5 mM) y AR-A014418 (20 μM) hasta 7 DIV. Como se muestra en la figura R35, en neuronas control β-catenina-pS33/37/T41 se concentra principalmente en el SIA, colocalizada con ankirina G. Por el contrario, en neuronas tratadas con litio, se pierde el marcaje de β-catenina-pS33/37/T41 a la vez que la intensidad del marcaje de ankirina G está significativamente reducido (2.5 veces menor) (**fig. R35 A y C**). Esta pérdida significativa de intensidad de ankirina G correlaciona perfectamente con un marcaje mínimo (o ausente) de β-catenina-pS33/37/T41. Idénticos resultados se obtuvieron cuando las neuronas fueron tratadas con AR-A014418 (20 μM) en comparación con neuronas control tratadas con DMSO (**fig. R35 B y C**).



Posteriormente, evaluamos las consecuencias funcionales de la inhibición de GSK3 y la disminución de la fosforilación de β -catenina, analizando las propiedades eléctricas de neuronas de hipocampo de CA3 a partir de cultivos organotípicos. En primer lugar, tratamos rodajas de hipocampo de cerebros postnatales P8 con AR-A014418 (20 μ M) o DMSO (vehículo). Después de 7 DIV comparamos la excitabilidad neuronal de ambos grupos por medio de técnicas electrofisiológicas (fig. R36). La inhibición de GSK3 con AR-A014418 generó una disminución significativa en la amplitud del último pico del tren de potenciales (relación entre el último y el primer pico: 0.80 ± 0.01 versus 0.86 ± 0.01 en neuronas tratadas con DMSO) (fig. R36 B y C). La misma atenuación en la amplitud del último pico (0.85 ± 0.01 vs 0.90 ± 0.02 , * $p < 0.05$) se generó cuando los registros se realizaron en presencia de bloqueantes de corrientes de potasio tipo M (XE991 10 μ M), y de canales de calcio (Cadmio 50 μ M).



Estos resultados sugieren que β -catenina fosforilada por GSK3 actúa como una proteína de anclaje en el SIA, regulando la organización estructural y la excitabilidad neuronal.

3.2 La supresión de β -catenina reduce la concentración de proteínas del SIA y la excitabilidad neuronal

Para comprender plenamente el papel de β -catenina-pS33/37/T41 en la maduración del SIA, se llevó a cabo una segunda estrategia experimental: la nucleofección de dos interferentes de β -catenina previamente caracterizados (fig. R25 y R26). Una vez nucleofectadas, las neuronas de hipocampo se mantuvieron en cultivo hasta 6 ó 14 DIV (cuando el SIA está completamente formado). Se midió la intensidad de fluorescencia a lo largo del SIA de un gran número de neuronas nucleofectadas con shRNA *scramble* o shRNA β -catenina y se obtuvo una media de intensidad de marcaje en cada condición (fig. R37 E y F). A partir de estos datos se establecieron tres categorías distintas según la intensidad del marcaje en el SIA: elevado, reducido o ausente. El marcaje se consideró reducido o débil cuando la intensidad de fluorescencia total fue $\leq 50\%$ de la intensidad media de neuronas con marcaje elevado en SIA. Ambos interferentes aumentaron significativamente el porcentaje de neuronas que presentaban un marcaje de β -catenina-pS33/37/T41 ausente o reducido en el SIA (fig. R37 A). El interferente denominado Sh1 (shRNA1) fue más eficiente que el Sh2 (shRNA2) en la reducción de los

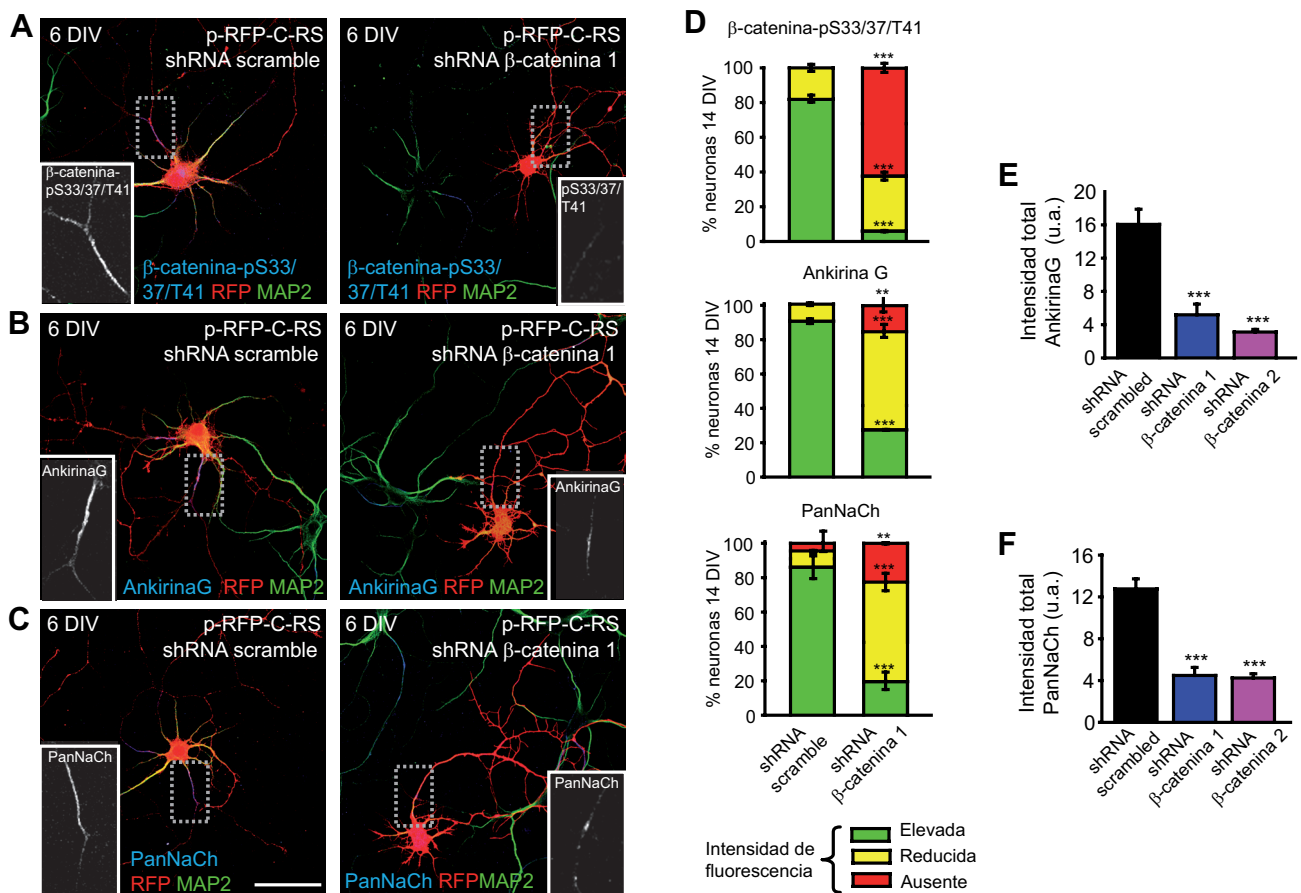


Figura R37. La supresión de β -catenina y β -catenina-pS33/37/T41 con ARN de interferencia durante estadios maduros reduce el anclaje de ankirina G y canales de sodio en el segmento inicial. (A, B, C) Neuronas de hipocampo de 6 DIV nucleofectadas con los plásmidos RFP (p-RFP-C-RS) que expresan el ARN de interferencia de β -catenina shRNA 1 o shRNA 2, o el control *scramble*. Una vez fijadas, las neuronas se tiñeron con anticuerpos contra β -catenina-pS33/37/T41 (A), ankirina G (B) o PanNaCh (C). El compartimiento somatodendrítico se identificó con el anticuerpo MAP2. Los recuadros muestran una visión ampliada del SIA (escala de grises). (D) Las gráficas muestran el porcentaje de neuronas de 14 DIV con un nivel de fluorescencia elevado (verde), reducido (amarillo) o total ausencia de fluorescencia (rojo) de β -catenina-pS33/37/T41, ankirina G o PanNaCh en el SIA. Las neuronas con una intensidad de fluorescencia menor del 50 % comparadas con el nivel elevado *scramble*, fueron incluidas en la categoría débil. Los datos representan la media \pm error estándar de 3 experimentos independientes (100 neuronas/ condición experimental de cada experimento).** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, comparadas con el shRNA *scramble*. (E, F) Los gráficos de barras representan la intensidad de fluorescencia total

de ankirina G y PanNaCh obtenida cada 0.4 μm a lo largo del SIA de 50 neuronas de cada experimento cuantificado en D. Sólo se escogieron las categorías de intensidad elevada y reducida. *** $p < 0.001$. Todas las imágenes fueron adquiridas usando los mismos parámetros de intensidad de fluorescencia, Barra de escala = 50 μm .

niveles de β -catenina, y sus efectos se incrementaron a 14 DIV comparado con los resultados de 6 DIV (**tabla R1**). Mientras un $82 \pm 1\%$ de las neuronas de 14 DIV nucleofectadas con shRNA *scramble* presentaban niveles elevados de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA, en contraste, sólo el $6 \pm 1\%$ de neuronas nucleofectadas con el shRNA 1 de β -catenina presentaron niveles elevados de la proteína en el SIA (**fig. R37 D**). Datos similares se obtuvieron en las neuronas nucleofectadas con el shRNA 2 de β -catenina (**tabla R1**). En vista de nuestros resultados, cuantificamos los niveles de otras proteínas (ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje (PanNaCh)). Sólo el $27 \pm 1\%$ de las neuronas nucleofectadas con el interferente 1 de β -catenina revelaron una concentración elevada de ankirina G en el SIA, en comparación con el $91 \pm 1\%$ de neuronas nucleofectadas con shRNA *scramble* (**fig. R37 B y D**). De acuerdo con la reducción de ankirina G, la expresión de los canales de sodio en el SIA se redujo en neuronas de 6 DIV y 14 DIV, exhibiendo la misma distribución en tres fenotipos claramente diferenciados (**fig. R37 C y D, tabla R1**).

Intensidad de fluorescencia		6 DIV (% neuronas)			14 DIV (% neuronas)		
		Elevada	Reducida	Ausente	Elevada	Reducida	Ausente
β -catenina	Scr	65 ± 4	15 ± 2	20 ± 3	82 ± 1	18 ± 1	0
	Sh1	13 ± 3 ***	25 ± 3	62 ± 5	6 ± 1 ***	32 ± 2	62 ± 1
	Sh2	35 ± 8 **	31 ± 5	34 ± 4	21 ± 1 ***	46 ± 2	33 ± 1
AnkirinaG	Scr	85 ± 2	13 ± 2	2 ± 1	91 ± 1	9 ± 1	0
	Sh1	37 ± 5 ***	44 ± 8	19 ± 5	27 ± 1 ***	58 ± 2	15 ± 2
	Sh2	68 ± 3 **	28 ± 1	4 ± 2	60 ± 4 ***	40 ± 4	0
PanNaCh	Scr	79 ± 3	14 ± 2	7 ± 2	86 ± 4	9 ± 1	5 ± 4
	Sh1	29 ± 1 ***	48 ± 3	23 ± 3	19 ± 3 ***	58 ± 3	23 ± 1
	Sh2	65 ± 4 *	28 ± 3	7 ± 2	53 ± 1 ***	43 ± 3	4 ± 2

Tabla R1. Resumen de las distintas categorías de intensidad de fluorescencia (elevada, reducida o ausente) de proteínas del SIA después de la expresión crónica de interferentes de β -catenina. Resumen de resultados de las tres categorías (expresión elevada, reducida o ausente en el SIA) de neuronas, establecidas en función de la intensidad de fluorescencia de cada marcador β -catenina-pS33/37/T41, ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje (PanNaCh)) en comparación con neuronas control *scramble*. Scr= shRNA *scramble*; Sh1= shRNA 1 de β -catenina, Sh2= shRNA 2 de β -catenina. Los resultados representan la media \pm error estándar del porcentaje de neuronas de cada categoría en 3 experimentos independientes (100 neuronas/ condición experimental de cada experimento). ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, en comparación con neuronas control *scramble*. Las neuronas que presentaban una intensidad de fluorescencia superior al 50 % del valor control fueron incluidas en la categoría elevada, mientras que las que presentaron una intensidad menor del 50 % se las incluyó en la categoría reducida.

A la luz de los resultados obtenidos, decidimos evaluar la repercusión fisiológica de la supresión de β -catenina y por extensión, de la eliminación de β -catenina-pS33/37/T41. Puesto que no contamos con ratones *Knock-out* condicionales de β -catenina, decidimos utilizar rodajas de cerebro de ratones postnatales P8 e introducir los plásmidos de interferencia de β -catenina mediante el sistema *Gene Gun*. Con esta herramienta conseguimos introducir de forma aleatoria en el tejido micropartículas de oro recubiertas de DNA mediante la creación de un flujo de helio de gran velocidad (ver sección material y métodos). En primer lugar evaluamos los parámetros pertinentes para su empleo en rodajas de cerebro de ratón postnatal de 8 días (presión de helio, edad de las secciones y viabilidad celular). Una vez optimizado todo el proceso introdujimos los plásmidos p-RFP-C-RS (*scramble* o β -catenina shRNA 1) en rodajas de cerebro de ratones P8 cultivadas durante dos días

in vitro, y las mantuvimos durante una semana más en incubación a 34°C (95 % O₂/ 5 % CO₂) para permitir la expresión de los plásmidos y la interferencia de β -catenina (**fig. R38 A y B**). Pasado este tiempo, realizamos registros electrofisiológicos y posteriormente fijamos y teñimos las secciones para confirmar por ensayos de inmunohistoquímica la expresión de las proteínas de interés. Registramos sólo neuronas RFP positivas que contuvieran una micropartícula visible en su interior (**fig. R38 C**).

La amplitud de la corriente de sodio evocada (por un comando de voltaje, *voltage-clamp*) desde un potencial

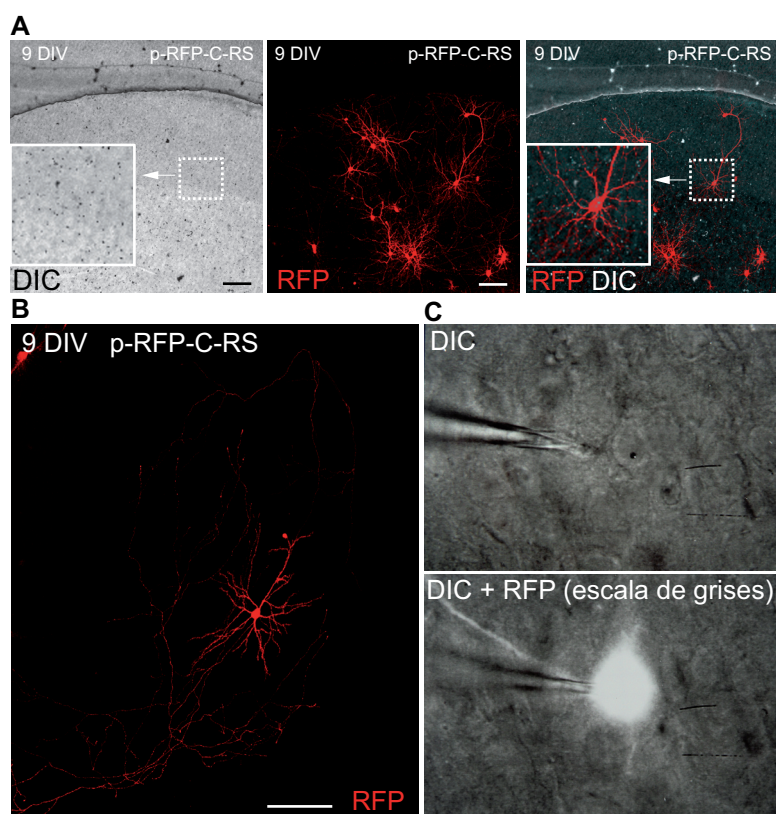


Figura R38. Introducción aleatoria de ADN en rodajas de cerebro en cultivo empleando la herramienta *Gene Gun* (A) Imágenes de neuronas piramidales de corteza de ratón transformadas con plásmidos p-RFP-C-RS empleando el sistema *Gene Gun* (RFP, rojo), a partir de cultivos organotípicos mantenidos en cultivo durante 9 días. Las micropartículas de oro aparecen como puntos negros (en la imagen de la izquierda) o puntos blancos (imagen de la derecha, inversión de la escala de grises) Barra de escala = 100 μ m. Los recuadros muestran una ampliación de la zona señalada. (B) Imagen de una neurona aislada del experimento anterior. Barra de escala = 100 μ m (C) Detalle de una neurona piramidal RFP positiva (escala de grises, izquierda) con una micropartícula en su interior (imagen derecha) en el momento del registro electrofisiológico.

de reposo de -80 mV a -20 mV se redujo significativamente en neuronas piramidales de la capa 5 que expresaban el interferente de β -catenina (Sh 1) (**fig. R39 A**). La densidad de corriente de sodio en ambos casos fue de 336 ± 31 pA/pF en neuronas *scramble* (Scr) y de 215 ± 30 pA/pF en neuronas que expresaban el interferente (Sh1) (**fig. R39 B**). A continuación se comparó la excitabilidad en ambos tipos de neuronas en *current-clamp* mediante la inyección de pasos de corriente de amplitud creciente. En comparación con neuronas control Scr, las neuronas que expresaban el interferente de β -catenina eran menos excitables (**fig. R39 C**) donde el número de picos de potencial de acción generados por 150, 200 o 250 pA se redujo significativamente (**fig. R39 D**). Al realizar la inmunohistoquímica posterior comprobamos que, las neuronas que expresaban el shRNA *scramble* exhibían un doble marcaje β -catenina-pS33/37/T41/ ankirina G positivo en el SIA, mientras que las neuronas nucleofectadas con el interferente de β -catenina se caracterizaron por una reducción significativa o una ausencia total de los marcajes de β -catenina-pS33/37/T41 y ankirina G (**fig. R39 E**).

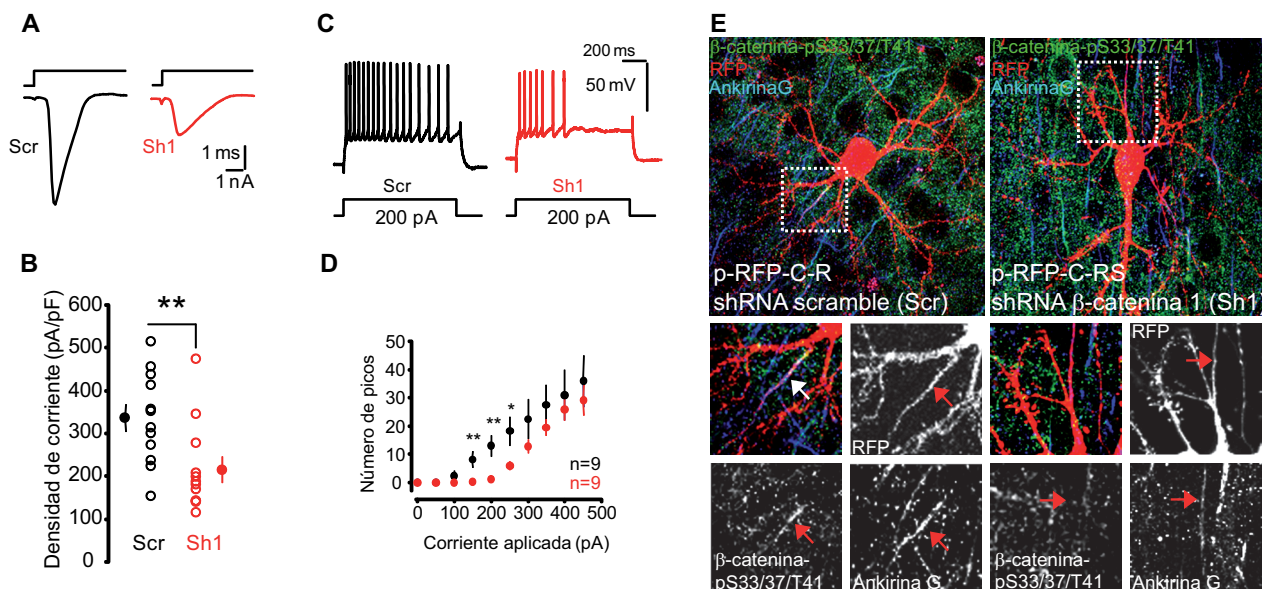


Figura R39. La interferencia de β -catenina disminuye la expresión de β -catenina-pS33/37/T41 y ankirina G en el SIA, la corriente de canales de sodio dependientes de voltaje y el disparo de potenciales de acción en rodajas de cerebro. Neuronas corticales representativas de cultivos organotípicos que expresan los plásmidos RFP: control *scramble* (Scr) o interferente de β -catenina 1 (Sh 1). Las rodajas de cerebro se obtuvieron a partir de ratones postnatales de 8 días y se cultivaron durante dos días antes de introducir los plásmidos con el sistema *Gene Gun*. Después de 7 días se realizaron los registros electrofisiológicos y posteriormente la fijación y tinción de las muestras. **(A)** Corrientes de sodio registradas a partir de neuronas piramidales corticales expresando el *scramble* (Scr) o el interferente de β -catenina 1 (Sh 1). Las corrientes fueron evocadas por un pulso de despolarización de -80 mV a -20 mV. **(B)** Gráfico de la densidad de corriente de sodio para neuronas control (Scr) o shRNA β -catenina (Sh 1). Nótese la reducción significativa de la densidad de corriente. Se registraron un total de 12 neuronas de cada condición experimental (Scr y Sh1). ** $p < 0.01$ **(C)** Perfil de disparo más representativo de neuronas Scr y neuronas Sh 1. **(D)** Curvas *input-output* que representan el número de picos de potencial de acción frente a la intensidad de corriente aplicada para neuronas Scr y Sh 1. Nótese la reducción significativa de la excitabilidad en neuronas Sh 1. * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$. **(E)** Una vez registradas, las secciones de cerebro se tiñeron con anticuerpos para β -catenina-pS33/37/T41 (verde) y ankirina G (azul). Las imágenes inferiores muestran una visión ampliada del segmento inicial donde las flechas señalan la posición del SIA. Nótese que las neuronas que expresan el interferente de β -catenina no son inmunoreactivas para β -catenina-pS33/37/T41 y al mismo tiempo se aprecia un descenso en el marcaje de ankirina G. Barra de escala = 50 μ m.

En conjunto, los datos obtenidos confirman que la agrupación de las proteínas del SIA depende en cierta medida de la expresión y concentración de β -catenina-pS33/37/T41, la cual desempeña un papel crucial en la maduración estructural y funcional del segmento inicial del axón.

Discusión

El propósito de este estudio ha sido mejorar nuestra comprensión de los mecanismos que gobiernan la formación y el mantenimiento del segmento inicial del axón, a través del análisis de proteínas relacionadas con la dinámica de MT. Para abordar un contexto tan amplio, decidimos dividir el estudio en dos bloques diferenciados: por un lado el papel de HDAC6 durante la morfogénesis neuronal, como regulador de la acetilación de MT y por otro lado incidir en la repercusión funcional de uno de los sustratos de GSK3, β -catenina, como sustrato canónico de una de las quinasas protagonistas en la regulación del citoesqueleto durante el neurodesarrollo.

1 IMPORTANCIA DE LA ACETILACIÓN DE TUBULINA EN PROCESOS DE NEURODESARROLLO

El citoesqueleto de MT neuronal no sólo constituye un soporte arquitectónico celular, sino que desempeña múltiples funciones: participa activamente en las etapas iniciales de la polarización neuronal, en la organización de los compartimentos intracelulares y organelas celulares, en la remodelación de las espinas dendríticas y en el tráfico de cargos hacia dominios pre, post o extrasinápticos (Janke and Kneussel, 2010). Dada su sencillez estructural, se han planteado diversas hipótesis para explicar su gran diversidad funcional. Una de ellas es la existencia de factores de variabilidad intrínseca, como las modificaciones reversibles posttraduccionales de tubulina o PTM, que se producen esencialmente en los extremos C-terminal de α y β tubulina en la superficie del cilindro del MT. La única modificación excluida de esta región es la acetilación de α -tubulina (L'Hernault and Rosenbaum, 1985; LeDizet and Piperno, 1987), localizada en el interior del lumen del MT (Nogales et al., 1998). Esta separación espacial del resto de modificaciones y la dificultad de acceso para los posibles sitios de interacción, hacen difícil explicar el papel potencial de la acetilación para la codificación de funciones de MT. Estudios pioneros en este campo demostraron que la mutación de la lisina 40 de α -tubulina no produce un fenotipo obvio en organismos inferiores como *Chlamydomonas*, *Tetrahymena*, o *C. elegans* (Kozminski et al., 1993; Gaertig et al., 1995; Fukushige et al., 1999). Por el contrario estudios más recientes realizados en ratón confirman que la sobreexpresión de un mutante no acetilable de α -tubulina provoca alteraciones en la migración neuronal, y sugieren que la acetilación en la lisina 40 está directamente implicada en la diferenciación neuronal (Creppe et al., 2009).

Las enzimas que regulan la acetilación y deacetilación de α -tubulina no fueron descubiertas hasta la pasada década, comenzando con la identificación de HDAC6 como una tubulina deacetilasa que regula los niveles de acetil- α -tubulina tanto *in vitro* (Hubbert et al., 2002), como *in vivo* (Matsuyama et al., 2002). Desde entonces, la función de HDAC6 ha sido objeto de numerosos estudios que ponen de manifiesto su relevancia en procesos de migración y adhesión celular (Tran et al., 2007; Zhang et al., 2007b), en mecanismos de degradación proteica (Yao, 2010), en la patogénesis del cáncer (Aldana-Masangkay and Sakamoto, 2011) y en enfermedades neurodegenerativas (Li et al., 2011b). Los ratones KO de HDAC6, aunque son viables y se desarrollan normalmente (Zhang et al., 2008), manifiestan alteraciones en el comportamiento emocional durante la etapa adulta (Fukada et al., 2012). La expresión de HDAC6 aumenta desde etapas embrionarias a postnatales en determinadas regiones cerebrales como el cerebelo o el hipocampo (<http://www.brain-map.org/>) y, sin embargo, su repercusión funcional no ha sido valorada durante estadios tempranos de desarrollo neuronal. El descubrimiento reciente de complejos enzimáticos que regulan el proceso de acetilación de α -tubulina durante la migración y diferenciación de neuronas corticales, como es el caso del complejo "Elongator" (Creppe et al., 2009), o la participación esencial del complejo ARD1-NAT1 durante el desarrollo dendrítico (Ohkawa et al., 2008), reflejan la importancia de la regulación de este proceso durante etapas tempranas de diferenciación neuronal. Con respecto a HDAC6, los datos obtenidos a partir de estudios *in vitro* muestran resultados dispares, y a veces contradictorios, en cuanto al desarrollo dendrítico. Si bien la supresión de HDAC6 impide el desarrollo dendrítico normal en neuronas de hipocampo y células granulares

de cerebelo (Kim et al., 2009), su sobreexpresión produce el mismo fenotipo en neuronas de Purkinje (Ohkawa et al., 2008). Estas contradicciones reflejan una regulación diferencial de HDAC6, y posiblemente de otras enzimas relacionadas, dependiendo del tipo neuronal y de su etapa de desarrollo y, por otro lado, resaltan la necesidad de valorar o interpretar contextualmente los resultados, antes de su extrapolación a otros modelos o a otros tipos neuronales.

En este trabajo escogimos un modelo *in vitro* de diferenciación neuronal bien caracterizado para estudiar la repercusión funcional de HDAC6, durante los procesos iniciales de axonogénesis, crecimiento axonal y especialmente durante la formación del segmento inicial del axón.

2 HDAC6 COMO NUEVO REGULADOR DEL CRECIMIENTO AXONAL

2.1 LA FUNCIÓN DEACETILASA DE HDAC6 ES NECESARIA PARA EL CRECIMIENTO AXONAL

El citoesqueleto de MT representa el punto donde convergen multitud de señales que desencadenan los procesos clave en la diferenciación y polaridad neuronal. Cambios locales en la dinámica de polimerización y ensamblaje de MT inician el proceso previo de especificación axonal. Durante su posterior elongación, los MT axonales sufren diversas modificaciones dirigidas a incrementar su estabilidad frente a ciclos rápidos de crecimiento y decrecimiento en la extensión del MT, entre ellas, modificaciones posttraduccionales de tubulina como la acetilación de α -tubulina (Schulze et al., 1987). Nuestros datos revelan una localización diferencial de tubulinas a lo largo del axón (**fig. R1**), donde, coincidiendo con regiones de mayor estabilidad (como indica el marcaje de tubulina detirosinada) la tubulina acetilada se concentra en zonas más proximales (Baas and Black, 1990; Brown et al., 1993). Con el propósito de analizar las consecuencias funcionales y morfológicas de esta acetilación en el axón, estudiamos tanto la distribución axonal de HDAC6 como su impacto durante el proceso de polarización y elongación axonal.

En primer lugar, la localización preferente de HDAC6 en zonas distales del axón, incluida el cono de crecimiento axonal (**fig. R2 y R3**), refleja una mayor regulación de la acetilación, y coincide con aquellas zonas donde se precisa una reorganización más dinámica del citoesqueleto. En segundo lugar, la inhibición de HDAC6 durante las primeras 48 horas de cultivo primario bloquea el proceso de especificación axonal (**fig. R5 y R6**). Basándonos en un estudio reciente, donde se demuestra que la proporción Ac- α -tubulina *versus* Tyr-tubulina se ve incrementada en la neurita que se especifica como axón (Witte et al., 2008), un incremento global en todas las neuritas de Ac- α -tubulina explicaría la pérdida de polaridad neuronal observada. Por otra parte, nuestros datos reflejan que la inhibición de HDAC6 incrementa los niveles de Ac- α -tubulina tanto de la fase ensamblada como de la fracción soluble de MT, si bien el valor es cuantitativamente superior en la fracción soluble. De hecho, la deacetilación de α -tubulina ocurre mayoritariamente en el *pool* soluble recién despolimerizado y más dinámico (Black et al., 1989; Matsuyama et al., 2002). También se ha sugerido que un aumento en los niveles de acetilación induce una mayor resistencia a la despolimerización de los MT más dinámicos (Matsuyama et al., 2002) y, por lo tanto, un desequilibrio en los niveles de acetilación en esta fracción soluble (dímeros y oligómeros no ensamblados) podría comprometer el proceso de inestabilidad dinámica en zonas que requieren un mayor crecimiento. Sin embargo, como todavía se desconoce el mecanismo exacto por el cual la acetilación de α -tubulina repercute en estos fenómenos, sólo podemos hacer meras conjeturas.

Por otro lado, HDAC6 puede regular directa o indirectamente la actividad de proteínas implicadas en la dinámica de MF, como son cortactina, Rac1 y Hsp90 (Gao et al., 2007b; Zhang et al., 2007b) y participar en la interacción entre microtúbulos y microfilamentos a través de la unión con proteínas de citoesqueleto como mDia2 o EB1 (Destaing et al., 2005). En este sentido nosotros observamos una pérdida notable de filopodia y lamelipodia en el cono de crecimiento axonal cuando suprimimos la actividad de HDAC6 (**fig. R10**). Dada la importancia de esta estructura para el proceso de axonogénesis (ver introducción, polaridad neuronal) la inhibición de HDAC6 puede comprometer el proceso de especificación axonal impidiendo un correcto reciclaje de las estructuras de adhesión, de acuerdo con lo observado en otras células (Tran et al., 2007).

La inhibición de HDAC6 posterior a los 2 días de diferenciación *in vitro* pone de manifiesto que su actividad es necesaria para la correcta elongación del axón, una vez es especificado. La supresión de HDAC6 empleando un ARN de interferencia o introduciendo en las neuronas un mutante inactivo, reproduce el mismo fenotipo de retardo en el crecimiento axonal (**fig. R7 y R11**). De acuerdo con nuestros resultados, el silenciamiento génico de HDAC6 reduce el crecimiento neurítico en células SH-SY5Y diferenciadas (Fiesel et al., 2011). Durante el proceso de elongación axonal se suceden reacciones de detirosinación y acetilación en los MT recién ensamblados, creándose un gradiente decreciente hacia las zonas distales más dinámicas y ricas en Tyr-T (Baas and Black, 1990; Ahmad et al., 1993; Brown et al., 1993). La inhibición y supresión de HDAC6 suponen la pérdida de este gradiente, y en consecuencia, los procesos de inestabilidad dinámica de MT podrían verse afectados. En este sentido se ha descrito que la inhibición de HDAC6 disminuye la tasa de crecimiento y retracción del microtúbulo, provocando un retardo en la velocidad de crecimiento del polímero (Zilberman et al., 2009). Este es un matiz importante a tener en cuenta, dado que los tratamientos con bajas dosis de taxol que incrementan los niveles de acetilación en MT (Piperno et al., 1987) no disminuyen la elongación axonal (Witte et al., 2008; Hammond et al., 2010), dado que sólo suprimen la velocidad de retracción del MT estimulando la polimerización del mismo (Derry et al., 1995).

A la luz de nuestros resultados, podemos afirmar que el fenotipo axonal resultante de la inhibición, supresión o expresión exógena de HDAC6 es dependiente de sus dominios catalíticos con función deacetilasa. Aunque la supresión de HDAC6 también puede producir una reducción significativa de la longitud y la ramificación dendrítica (Kim et al., 2009), este efecto es sólo dependiente de su región UBD de unión a ubiquitina. Nuestros datos reflejan claramente que la región UBD no es determinante en el crecimiento axonal (**fig. R11**), sin embargo, no podemos descartar que la función TDAC de HDAC6 pueda intervenir en la regulación de la morfología dendrítica. Estudios realizados en neuronas de hipocampo más maduras, de 23 DIV, revelan una concentración crítica del complejo ARD1-NAT1 en dendritas regulando el desarrollo dendrítico a través de su actividad acetilasa (Ohkawa et al., 2008). Dado que nuestros experimentos generalmente no sobrepasan los 4 DIV, momento crítico para el desarrollo dendrítico (Baas et al., 1989), no podemos valorar correctamente parámetros de maduración dendrítica.

De todos modos, aunque HDAC6 se localiza preferentemente en axón también se localiza en las neuritas restantes, e igualmente podemos apreciar un incremento de la acetilación en el compartimiento somatodendrítico al inhibir su función deacetilasa (**fig. R18**). En conjunto, al margen de sus posibles implicaciones en maduración y desarrollo dendrítico, podemos concluir que HDAC6 regula el crecimiento axonal principalmente modulando los niveles de acetilación de α -tubulina.

2.2 REGULACIÓN AXONAL DE HDAC6

HDAC6 es la única deacetilasa de clase II localizada preferentemente en el citoplasma celular. En este estudio, por primera vez, describimos su presencia mayoritaria en axón a través de anticuerpos específicos o mediante la expresión de diferentes plásmidos de expresión de HDAC6. En ambas aproximaciones experimentales la proteína se concentra siguiendo un patrón creciente hacia la región distal del axón, salvo en el caso de la expresión del mutante inactivo de HDAC6, cuando la actividad deacetilasa se halla perjudicada o ausente. Cuando suprimimos la expresión endógena de HDAC6 con la introducción de una ARN de interferencia, observamos una pérdida significativa del marcaje principalmente axonal (**fig. R8**). Todos estos resultados sugieren un papel primordial de la actividad de HDAC6 en el axón donde sus dominios deacetilasa son necesarios para su localización en gradiente.

Una de las principales diferencias entre neuronas y células no neuronales es la presencia de la proteína tau, como moduladora esencial de MT axonales. Nuestros datos muestran un patrón similar de localización axonal de tau-1 y HDAC6. De hecho, HDAC6 interacciona con la proteína tau (Ding et al., 2008) y se ha sugerido una regulación recíproca entre ambas proteínas, de tal forma que, la actividad de HDAC6 podría modular la fosforilación de tau (Ding et al., 2008) y en sentido opuesto tau podría inhibir la función de HDAC6 (Perez et al., 2009). La fosfatasa PP1 es reclutada a MT por mediación de tau (Liao et al., 1998), a la cual defosforila y se une a MT, incrementando su estabilidad. En este sentido, se ha demostrado en células HEK293T que la actividad del dominio D2 de HDAC6 es fundamental para la interacción con la fosfatasa PP1, ligada a una fracción de tubulina (Brush et al., 2004). Este hecho podría explicar en parte por qué la función deacetilasa de HDAC6 es necesaria para su localización axonal. En conjunto, la fosfatasa PP1 podría facilitar el reclutamiento de HDAC6 a MT para modular su dinámica. Una vez localizado en MT, el complejo HDAC6-PP1, podría ser regulado por la proteína tau en función de las necesidades de estabilidad. La inactivación de HDAC6 liberaría a PP1, que podría actuar sobre tau incrementando su unión a MT y por lo tanto su estabilidad. Esta hipótesis cobra más sentido si tenemos en cuenta el efecto opuesto que ejercen tanto tau como HDAC6 en la dinámica de MT. Por un lado tau confiere mayor estabilidad al MT, mientras que HDAC6 elimina los grupos acetilo del MT generando mayor dinamismo.

No obstante, la actividad fosfatasa de PP1 abarca un gran número de quinasas y proteínas asociadas a MT, entre las cuales se encuentran las quinasas Akt (Chen et al., 2005) y GSK3 (Hernandez et al., 2010). Dada la importancia de esta última en polaridad y crecimiento axonal, uno de nuestros objetivos fue valorar la posible relación entre la actividad de GSK3 y la función de HDAC6. En esta misma línea, recientemente se ha publicado que GSK3 y HDAC6 colocalizan y coinmunoprecipitan en neuronas de hipocampo y que la actividad de GSK3 puede potenciar la función deacetilasa de HDAC6 (Chen et al., 2010). Nuestros resultados sugieren una asociación entre la inhibición de GSK3 y un incremento en los niveles de acetilación, coincidiendo con los resultados obtenidos por otros grupos (Witte et al., 2008; Hammond et al., 2010). Aunque no podemos establecer una relación directa entre GSK3 y HDAC6, resultaría más que interesante profundizar en el complejo formado por HDAC6-tau y su regulación por GSK3. De hecho, la quinasa GSK3 puede actuar sobre tau y regular tanto su unión a MT (Utton et al., 1997) como su transporte mediado por kinesina 1 (Cuchillo-Ibanez et al., 2008). La actividad de GSK3 sobre HDAC6 y tau implicaría un aumento en la inestabilidad de microtúbulos, necesaria para mantener un mayor dinamismo durante el proceso de especificación axonal (Garrido et al., 2007).

Sin lugar a dudas, el estudio de la pérdida de función de HDAC6 revela un papel fisiológico de la proteína, puesto que define una necesidad neuronal de su actividad durante el crecimiento axonal. Sin embargo, resulta

llamativo no encontrar diferencias significativas cuando introducimos diferentes plásmidos de expresión de HDAC6 en neuronas. La ausencia aparente de fenotipo (puesto que no observamos cambios en la longitud axonal (**fig. R4 y R11**)) se corresponde con una ausencia en la variación de los niveles de acetilación. Este hecho puede ser explicado en base a los niveles basales de tubulina acetilada, muy elevados, encontrados en neuronas con respecto a otros tipos celulares. Esta diferencia es evidente incluso a nivel tisular donde la expresión de tubulina acetilada en cerebro supera en varios órdenes de magnitud la encontrada en otros tejidos (Zhang et al., 2008). Por otro lado, la sobreexpresión de HDAC6 durante 3 DIV podría haber activado una serie de mecanismos de compensación a distintos niveles. Debemos tener en cuenta la más que probable participación de acetilasas recientemente descritas, en procesos de migración y desarrollo neuronal (Ohkawa et al., 2008; Creppe et al., 2009). Dado que el proceso de acetilación del polímero de MT es más rápido que el proceso de deacetilación (Matsuyama et al., 2002), la actuación de enzimas acetilasas podría suponer una reversión rápida de la hipoacetilación provocada por la actividad exógena de HDAC6, y de este modo, en este sistema de regulación la pérdida de acetilación se compensaría mucho mejor que su exceso. Además, como hemos mencionado, HDAC6 puede ser regulada por tau y/o GSK3, lo cual podría condicionar la disponibilidad y accesibilidad a MT, al menos en el axón.

2.3 HDAC6 PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DEL TRANSPORTE MEDIADO POR KINESINA-1

Dada la repercusión de la función de HDAC6 en la identidad y morfología axonal, uno de los objetivos de este estudio fue valorar su posible repercusión sobre el transporte axonal, estudiando la localización de la kinesina KIF5C. Una de las consecuencias biológicas de las PTM es la regulación del tráfico intracelular mediado por kinesinas, desempeñando una función de “señal de tráfico” hacia determinados destinos subcelulares (Verhey and Gaertig, 2007). Las kinesinas participan en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad neuronal mediante el transporte selectivo de diversas proteínas y vesículas, ya sea hacia el axón o a las dendritas (Nakata and Hirokawa, 2007). Concretamente KIF5, o kinesina-1, es un marcador temprano de polaridad neuronal (Jacobson et al., 2006) esencial en el tráfico hacia el axón de diversos cargos (Hirokawa et al., 2010).

Nuestros datos reflejan que la inhibición sostenida o la supresión de HDAC6 durante el crecimiento axonal incrementan la acetilación de los MT y modifican la distribución global de KIF5C (**fig. R18 y R19**). Asimismo comprobamos que la pérdida del gradiente hacia el cono de crecimiento de KIF5C se corresponde con una pérdida equivalente del gradiente de acetilación a lo largo del axón, asociado a una concentración evidente en soma (**fig. R18**). Por el contrario, un estudio reciente muestra que el tratamiento con TSA o tubacina a tiempos cortos (alrededor de 3 horas) no modifica la localización exógena de kinesina-1 (Hammond et al., 2010). No obstante, nuestros datos demuestran que una inhibición o supresión sostenida de HDAC6 alteran la distribución de KIF5C endógena a lo largo de la neurona. Apoyando nuestros resultados, un aumento en la acetilación de los microtúbulos, como resultado de la inhibición de HDAC6, incrementa tanto la unión de kinesina-1 como su velocidad de transporte a través de los MT, generando una distribución no polarizada de JIP-1 (Reed et al., 2006). Trabajos más recientes confirman una unión y un tráfico preferentes de KIF5 a través de microtúbulos detirosinados y acetilados y, por lo tanto, postulan que el tráfico diferencial de KIF5C a través de los MT depende de su balance en PTM (Dunn et al., 2008). Por lo tanto, aunque por sí sola la acetilación no parece dirigir a kinesina 1 (Hammond et al., 2010), detirosinación y acetilación (dado que no son excluyentes) contribuirían a regular el tráfico de cargos de kinesina-1. En conjunto, señales como el balance tyr/De-tyr-tubulina funcionarían en asociación con los niveles de acetilación para la regulación precisa del transporte de kinesina-1 (Konishi and Setou, 2009).

La alteración en el transporte normal de KIF5, podría influir a su vez en otros motores moleculares, dado que participa en el transporte anterógrado previo del complejo dineína-dinactina hacia los terminales axónicos. Aunque KIF5 se mueve preferentemente hacia los axones (Nakata and Hirokawa, 2003) también puede conducir el tráfico hacia dendritas de determinados complejos (receptor AMPA, GABA o complejos con ARN mensajero) (Hirokawa et al., 2010), lo que podría influir adicionalmente en la morfogénesis dendrítica. Por otro lado, distintas kinesinas son sensibles de forma diferencial a la presencia específica de PTM (Westermann and Weber, 2003; Verhey and Gaertig, 2007). Por ejemplo la poliglutamilación de α -tubulina puede modular el tráfico de vesículas sinápticas mediado por KIF1A y sin embargo, no interfiere en el tráfico mediado por KIF5 (Ikegami et al., 2007).

Finalmente una alteración en el tráfico de cargos mediado por KIF5C podría repercutir a distintos niveles en procesos fundamentales como polaridad neuronal, crecimiento y maduración neuronal, lo cual redundaría en el fenotipo axonal definido anteriormente a consecuencia de la inactivación funcional de HDAC6.

3 HDAC6, NUEVA PROTEÍNA IMPLICADA EN LA FORMACIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

3.1 LA IMPORTANCIA DE LAS MODIFICACIONES POSTTRADUCCIONALES DE TUBULINA EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

Aunque los MT acetilados y detirosinados se localizan aparentemente a lo largo de la neurona de forma homogénea, se asocian de forma específica a la estructura del SIA, como demuestra su restricción específica en SIA después de una extracción con Tritón X-100 (**fig. R1**). Por el contrario, la tubulina tirosinada es más lábil al tratamiento con Tritón X-100 y desaparece de la gran mayoría de segmentos iniciales. Estos resultados concuerdan con ensayos previos donde ensayos de inmunocitoquímica reflejan una proporción o balance de De-tyr/Tyr-tubulina superior en los MT del SIA (Konishi and Setou, 2009). Igualmente, experimentos realizados por nuestro laboratorio establecen que tanto la acetilación como la detirosinación son modificaciones presentes en MT asociados al SIA (Sanchez-Ponce et al., 2011a).

Como hemos comentado en secciones previas, la acetilación y la detirosinación de tubulina son modificaciones relacionadas con la dinámica de unión de kinesinas como KIF5. Hemos visto que estas modificaciones se concentran esencialmente en el axón, durante estadios tempranos, y se asocian específicamente a la red de MT del segmento inicial, pudiendo contribuir al tráfico polarizado de vesículas hacia el axón. Dado que la barrera de difusión en SIA comienza su formación a partir del tercer día *in vitro* (Song et al., 2009) la detirosinación y acetilación de MT axonales podrían dirigir la unión preferencial de KIF5 al axón inicialmente y, una vez formada la barrera de difusión, mecanismos basados en MT continuarían participando en la regulación del filtro axonal (Arnold, 2009). Adicionalmente este subconjunto de MT en la región proximal del axón sugiere un recambio y/o translocación de subunidades a tasas mucho más lentas que el resto de MT axonales (Shea, 1999). La acetilación de α -tubulina es un claro síntoma de estabilidad estructural, y en un dominio de elevada cohesión y resistencia como el SIA adquiere un mayor significado funcional. Por otro lado, la red de neurofilamentos en el SIA es particularmente densa y estática debido a las interconexiones con la red de MT (Hirokawa, 1982; Yuan et al., 2009). Todo este conjunto de elementos que conforman el citoesqueleto asociado al SIA otorgan a este dominio una estabilidad y cohesión características.

3.2 EL PAPEL DE HDAC6 EN LA FORMACIÓN DEL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

La formación del SIA es un proceso secuencial que se inicia justo después del proceso de especificación axonal, donde la proteína clave que dirige el proceso de anclaje de proteínas específicas en esta región es ankirina G. Nuestros datos muestran que un descenso mantenido en los niveles de expresión de HDAC6 altera la localización restringida de proteínas del SIA, que difunden más allá de la longitud establecida para este dominio. Hemos discutido hasta el momento cómo la función de HDAC6 puede modificar el crecimiento axonal y regular la localización específica de un transportador molecular, KIF5C. Una alteración durante eventos tempranos de elongación y creación de dominios diferenciados podría repercutir en la correcta formación del segmento inicial del axón. Sin embargo, no observamos una pérdida de polaridad específica de proteínas en el SIA, dado que ankirina G sigue localizándose en el primer tramo proximal del axón, lo que nos indica que HDAC6 no es una proteína fundamental en la localización específica de proteínas en el segmento inicial, sino más bien una proteína necesaria para su concentración restringida. Con respecto a la retención en SIA de canales de sodio dependiente de voltaje, sabemos que una vez transportados a membrana son retenidos específicamente en esta región, por medio de un dominio de interacción con ankirina G (Garrido et al., 2003a; Garrido et al., 2003b). Por lo tanto, podemos relacionar la pérdida de canales de sodio con una alteración en la localización restringida de ankirina G. En resumen, nuestros resultados nos permiten sugerir que la pérdida de concentración de ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje es debida a la ausencia de un dominio específico de microtúbulos, con características diferenciadas en el segmento inicial del axón, lo que impide una correcta inmovilización de determinadas proteínas.

De hecho, la inhibición de HDAC6 además de potenciar la acetilación global, supone una pérdida de la distribución específica de α -tubulina acetilada en el SIA después de la extracción con detergente, que aparece distribuida a lo largo del axón (**fig. R15**). Este no deja de ser un resultado cuanto menos llamativo, pues esta resistencia característica viene definida por la agrupación y cohesión específica de proteínas y lípidos de membrana en el SIA (Winckler et al., 1999; Garrido et al., 2003b). Podríamos conjeturar que un nivel anormalmente elevado de la acetilación produce cambios en las propiedades de los MT, que adquieren una resistencia similar a la resistencia del SIA, o bien, que esta propiedad del SIA está conferida por las características especiales de los microtúbulos en el SIA, que servirían de base de anclaje de proteínas que mantienen agrupadas las proteínas de membrana y lípidos. Como consecuencia de estos cambios en las propiedades de los MT axonales se produce una deslocalización de ankirina G, durante los estadios tempranos de formación del SIA, puesto que ankirina G reproduce un fenotipo similar tras la exposición a TSA durante un intervalo de tiempo similar (de 3 a 6 DIV) (**fig. R12**). Por consiguiente, un cambio en la distribución de ankirina G provoca que otras proteínas que interactúan con ankirina G, como canales de sodio dependiente de voltaje, difundan a lo largo del axón. De hecho ankirina G es capaz de restringir específicamente la difusión de proteínas que interactúan con ella antes de que se forme la barrera de difusión en SIA (Brachet et al., 2010).

En relación a la función deacetilasa de HDAC6 sobre otros sustratos, como apuntamos anteriormente, HDAC6 puede producir cambios significativos en la dinámica de polimerización de actina, lo que podría repercutir en la desorganización del segmento inicial del axón y en el anclaje específico de proteínas (Winckler et al., 1999; Nakada et al., 2003) y organelas asociadas específicamente al SIA, como determinadas cisternas derivadas del retículo endoplásmico liso (Sanchez-Ponce et al., 2011b).

En conjunto, la distribución de HDAC6 en la región distal del axón y su ausencia en la porción proximal del axón podrían regular la formación de dominios específicos de microtúbulos en el axón. Mientras que la actividad de HDAC6 en el axón distal puede promover el crecimiento axonal, generando microtúbulos menos acetilados y más dinámicos, su ausencia de la región proximal del axón permitiría la presencia de MT con un mayor grado de acetilación que pueden participar en el mantenimiento del SIA, necesario para el tráfico polarizado axonal y para la localización de proteínas específicas (fig. D1).

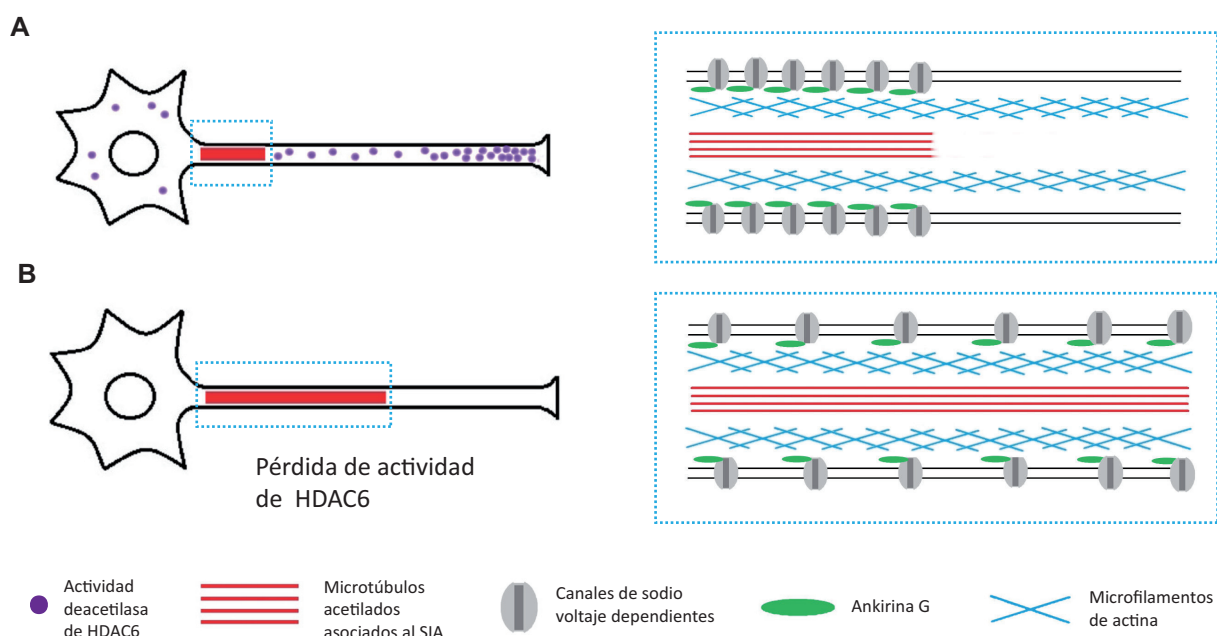


Figura D1. La actividad de HDAC6 regula el anclaje de ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje modulando los niveles de α -tubulina acetilada. (A) Esquema representativo de las proteínas del segmento inicial en condiciones normales. (B) En condiciones de supresión o inhibición de HDAC6, la tubulina acetilada asociada a la red de MT del SIA se distribuye a lo largo del axón, y se pierde la concentración específica de ankirina G y canales de sodio dependientes de voltaje.

4 EL SIA DEPENDE DE LA INTEGRIDAD DE SU RED DE MT ASOCIADOS Y SUS PROPIEDADES VARÍAN EN FUNCIÓN DE SU FASE DE MADURACIÓN

La integridad de la red de MT parece un factor a tener en cuenta, a la hora de valorar las propiedades de anclaje de proteínas del segmento inicial del axón. Nuestros resultados indican que una exposición moderada frente a fármacos que modulan la dinámica de MT repercute de un modo diferencial en la localización de proteínas del SIA. Por un lado observamos que la exposición a nocodazol afecta en mayor medida a proteínas asociadas a MT como EB1 (fig. R33), mientras que la localización de ankirina G aunque se ve afectada, no muestra una diferencia tan acusada, dado que no es una proteína que interaccione directamente con MT. Sin embargo, tanto la exposición a taxol como a TSA provocan una pérdida notable de ankirina G en el SIA de neuronas maduras (fig. R16 y R17). Como se ha discutido anteriormente, ambos fármacos no afectan de la misma forma a la inestabilidad dinámica, aunque los dos incrementan los niveles de acetilación de tubulina. Por otro lado, las alteraciones observadas en ankirina G por exposición a TSA en neuronas más jóvenes es cualitativamente diferente. No debemos olvidar que el segmento inicial del axón sigue su desarrollo y maduración hasta los 10 DIV, con el ensamblaje de componentes adicionales, que ayudan a compactar la estructura, lo que explicaría una mayor susceptibilidad de ankirina G a los niveles de acetilación durante los primeros días de diferenciación *in vitro*. Así pues, podríamos plantear en primer lugar que la alteración de los niveles de acetilación en neuronas afecta de forma diferencial a determinadas proteínas según el estado de maduración del SIA. La complejidad molecular del SIA aumenta con respecto al tiempo

de desarrollo tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, la acumulación específica de EB1 y EB3 sólo se observa después de la primera semana de diferenciación *in vitro* (Leterrier et al., 2011b), siendo necesarias para el mantenimiento de ankirina G en etapas más maduras. A diferencia de otras proteínas asociadas a MT, como la que reconoce el marcador 14D4 (**fig. R17**), EB1 y EB3 sí son susceptibles al tratamiento con taxol al igual que ankirina G (**fig. R33**) (Leterrier et al., 2011b). Por lo tanto, el efecto diferencial encontrado precisamente en estas proteínas de citoesqueleto puede explicarse teniendo en cuenta las necesidades de interacción o dependencia de ciertas proteínas en función del nivel de desarrollo del SIA.

En resumen, la integridad de MT es esencial para desempeñar, entre otras, su función como barrera al transporte retrógrado en el SIA (Li et al., 2011c). En este estudio vamos más allá y demostramos, por primera vez, que la integridad de los MT es necesaria para un correcto anclaje de proteínas en el SIA. Dado que las propiedades de este anclaje parece variar en función de su estadio de maduración, la búsqueda de nuevas proteínas implicadas en estos procesos podría aportarnos nuevas pistas para la comprensión de la complejidad del SIA y sus funciones asociadas.

5 PAPEL DE β -CATENINA Y GSK3 EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN

En este trabajo describimos una nueva proteína en el segmento inicial del axón relacionada con MT, que aparece durante el proceso de maduración del SIA tanto *in vitro* como *in vivo*. Nuestra demostración de que β -catenina-pS33/37/T41 en el segmento inicial del axón cumple una función de cohesión estructural ofrece una nueva visión de la organización de este dominio, particularmente relevante para el desarrollo debido a su relevancia en la iniciación del potencial de acción y en el control del tráfico axonal polarizado.

5.1 β -CATENINA *VERSUS* β -CATENINA-pS33/37/T41

β -catenina es una proteína versátil con múltiples proteínas de unión y diversas localizaciones subcelulares. Sus dos funciones esenciales: adhesión intercelular dependiente de calcio y activación transcripcional mediada por Wnt, son reguladas a través de la interacción con proteínas específicas y fosforilación de residuos a lo largo de su secuencia (Xu and Kimelman, 2007; Verheyen and Gottardi, 2010). Desde hace una década se asume que β -catenina es regulada a la baja por GSK3, creando un sitio de reconocimiento específico para la maquinaria de degradación de la célula. Sin embargo, los resultados que presentamos en este trabajo, apoyados en la bibliografía reciente, constituyen un cambio de paradigma en lo que respecta a la función de β -catenina una vez es fosforilada por GSK3.

En primer lugar, nuestros resultados indican que, en contra del dogma establecido, β -catenina-pS33/37/T41 no siempre es degradada, ni representa sólo una isoforma transitoria de corta vida media. Aunque los niveles totales de β -catenina-pS33/37/T41 aumentan en el soma en presencia de un inhibidor de proteasoma, (**fig. R29**), también observamos diferentes localizaciones subcelulares a lo largo del desarrollo neuronal en ausencia del mismo. Esto demuestra que la degradación de β -catenina-pS33/37/T41 parece estar determinada por su localización subcelular, tal y como demuestra un trabajo previo (Sadot et al., 2002). No obstante, podrían existir mecanismos de protección alternativos o adicionales que garantizaran la función de esta nueva fosfoproteína. Por ejemplo, algunos autores consideran que β -catenina-pS33/37/T41 es una nueva proteína cliente de Hsp90, dado que aparecen en el mismo complejo (coinmunoprecipitan) y la inhibición de la actividad de Hsp90 provoca la disminución de los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 (Cooper et al., 2011). Otras proteínas con función chaperona, como 14-3-3 pueden interaccionar y estabilizar a β -catenina (Tian et al., 2004).

En segundo lugar, la fosforilación de β -catenina en los residuos diana de GSK3 puede excluirla de sus funciones clásicas en adhesión y transcripción. Varias publicaciones en este sentido confirman la incapacidad de β -catenina-pS33/37/T41 para interactuar con cadherinas (Sadot et al., 2002; Faux et al., 2010; Maher et al., 2010), lo cual coincide con nuestros resultados (**fig. R30**). Igualmente se ha comprobado la ineficacia de β -catenina-pS33/37/T41 en la formación de un complejo ternario con LEF-1 y ADN (Sadot et al., 2002), lo que explicaría que la función transcripcional de β -catenina, dependiente de la vía de señalización de Wnt, correlacione mejor con la forma principal de β -catenina encontrada en núcleo, no fosforilada en la región N-terminal (Staal et al., 2002; Hendriksen et al., 2008).

En base a todo lo expuesto, disponemos de suficientes argumentos para establecer una nueva hipótesis: que GSK3 puede crear una nueva proteína con una presumible función estructural. De hecho, GSK3 es también un importante efector por debajo de la vía de PI3-quinasa, implicada en el proceso de polaridad neuronal, y en la regulación de la dinámica de microtúbulos controlando la fosforilación de diferentes proteínas asociadas como APC, tau, CRMP2 y MAP1B (ver introducción). En una misma línea, localizamos la proteína β -catenina fosforilada por GSK3 concentrada en MT a lo largo de las neuritas en neuronas de hipocampo en estadio 2 y en centrosoma. Posteriormente, una vez desarrollado el axón, β -catenina-pS33/37/T41 colocaliza con la proteína tau-1 a lo largo del axón en crecimiento (**fig. R21 y R22**). Estos resultados reflejan que la actividad local de GSK3 en la región distal del axón es necesaria durante la primera etapa de polaridad neuronal (Garrido et al., 2007) y nos plantean un nuevo interrogante, si β -catenina-pS33/37/T41 puede tener una función axonal que se ve comprometida con la inhibición de GSK3. Si así fuera, el fenotipo de pérdida axonal podría asociarse con la función de GSK3 sobre proteínas asociadas a MT, entre ellas β -catenina-pS33/37/T41. No obstante, debemos tener en cuenta que otras quinastas de especial relevancia como JNK pueden fosforilar a β -catenina en los mismos residuos que GSK3 (Hirai et al., 2011), y al mismo tiempo, regular la estabilidad de MT durante el crecimiento axonal (Hirai et al., 2006). Sin embargo, β -catenina es uno de los sustratos canónicos de GSK3 y por esa razón en nuestro estudio nos hemos restringido a la actividad de esta quinasa. GSK3 también puede interactuar con APC y regular su unión a MT en estructuras de migración glial (Etienne-Manneville and Hall, 2003) y en conos de crecimiento axonal (Zhou et al., 2004). También se ha descrito una función similar para β -catenina, que interactúa con APC y puede regular su unión a MT (Votin et al., 2005; Sharma et al., 2006). Nuestros datos muestran una localización similar de β -catenina-pS33/37/T41 y APC a lo largo del axón, lo cual sugiere nuevamente una asociación con microtúbulos axonales, probablemente a través de APC. Por otro lado, la unión a APC y cadherina con β -catenina es mutuamente excluyente (Rubinfeld et al., 1995).

Finalmente, debemos señalar las diferencias observadas en la tinción inmunocitoquímica de ambos anticuerpos, puesto que β -catenina se localiza en territorios de adhesión y β -catenina-pS33/37/T41 ocupa las zonas de tubulina (**fig. R21**). Este fenómeno probablemente se produzca a consecuencia de interacciones moleculares que enmascaren el epítipo de la región C-terminal, reconocido por el anticuerpo de β -catenina, dado que en ensayos de inmunocitoquímica se mantiene la estructura terciaria de las proteínas. Por último, debemos insistir en la posibilidad de un cambio conformacional en la proteína β -catenina una vez es fosforilada por GSK3, como han sugerido varios autores para explicar la segregación funcional de esta proteína (ver introducción, β -catenina).

Como apunte final, debemos abandonar la premisa inicial de que la fosforilación de β -catenina solamente es un medio para la destrucción de la proteína, y que por lo tanto, una vez fosforilada puede desempeñar nuevas funciones. Su fosforilación constituiría pues un nuevo modo de divergencia funcional y un aprovechamiento máximo de una proteína con un elevado potencial estructural.

5.2 ACUMULACIÓN PROGRESIVA DE β -CATENINA-pS33/37/T41 EN EL SEGMENTO INICIAL DEL AXÓN.

A medida que avanzamos en el desarrollo neuronal, β -catenina-pS33/37/T41 cambia su localización preferente, siempre asociada a estructuras de microtúbulos. Durante los primeros estadios de diferenciación *in vitro* se concentra mayoritariamente en centrosoma y en neuritas pero, a medida que la neurona va madurando y aumentando su complejidad morfológica, es notable su concentración axonal hasta alcanzar una concentración máxima en SIA, a partir del tercer día de diferenciación *in vitro*. De hecho, los niveles de la proteína analizados, demuestran una concentración superior en esta región a la encontrada en centrosoma, incluso en neuronas maduras de más de 20 DIV (**fig. R24 y fig. D2**). ¿Cual puede ser el significado funcional de este nuevo emplazamiento preferencial de β -catenina-pS33/37/T41? Varios estudios han demostrado un papel crítico de β -catenina-pS33/37/T41 en centrosoma, como regulador del anclaje de MT (Huang et al., 2007) o como proteína clave en el mantenimiento de las divisiones simétricas y los procesos de polaridad celular en precursores neuronales (Chilov et al., 2011). Sin embargo, la función primordial del centrosoma como centro de nucleación de MT se pierde después de la especificación axonal, una vez el axón comienza su desarrollo (Baas et al., 2006; Stiess and Bradke, 2010; Stiess et al., 2010), y parece tener sólo un valor vestigial una vez la neurona ha alcanzado un nivel de desarrollo considerable. Por lo tanto, coincidiendo con este periodo y, en detrimento del centrosoma, β -catenina-pS33/37/T41 parece reforzar su posicionamiento en una estructura con creciente significado funcional, el SIA. De hecho, ambas estructuras comparten una complejidad estructural similar, con un número elevado de proteínas fuertemente cohesionadas y al igual que en el centrosoma (Fumoto et al., 2006) la quinasa GSK3 se localiza también en el segmento inicial del axón (**fig. R34**).

Por otro lado el centrosoma constituye una reserva de β -catenina-pS33/37/T41 que podría ser aprovechado por la neurona. Curiosamente, la proteína EB1 es requerida para la formación y mantenimiento de la red de MT radiales al centrosoma y se encuentra, al igual que β -catenina-pS33/37/T41, en segmentos iniciales de neuronas maduras. De hecho, el marcaje de las dos proteínas coincide en ambas regiones ((Huang et al., 2007) y **fig. R33**) y aunque no parece existir una interacción entre ellas, en el centrosoma existe una dependencia de β -catenina para el posicionamiento de EB1 (Huang et al., 2007). Teniendo en cuenta que EB1 se concentra en SIA en etapas posteriores a β -catenina-pS33/37/T41, podríamos pensar en una dependencia similar de EB1 para su localización en el segmento inicial del axón. Experimentos adicionales en este sentido serían necesarios para establecer una posible relación entre ambas proteínas en el segmento inicial del axón.

β -catenina-pS33/37/T41 muestra un progresivo enriquecimiento en el SIA durante el desarrollo, *in vitro* e *in vivo*, coincidiendo con el establecimiento de barreras que regulan tanto la difusión en la membrana plasmática como el tráfico citoplasmático de macromoléculas. Después de 7 DIV, detectamos un porcentaje muy elevado de neuronas con β -catenina-pS33/37/T41 concentrado en SIA, cuando la barrera de difusión de membrana en el segmento inicial es completamente funcional (Brachet et al., 2010). De hecho, la barrera de difusión de membrana aún no ejerce su función de filtro hasta día 4 *in vitro*, cuando sólo un pequeño porcentaje de las neuronas muestran una concentración elevada de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA. Además, la barrera de tráfico citoplasmático en el segmento inicial comienza a aparecer a partir de los 3 DIV y se completa en 5 DIV (Song et al., 2009) cuando por lo menos un 70 % de las neuronas muestran β -catenina-pS33/37/T41 anclada en los SIA. Esta coincidencia temporal abre la posibilidad a una posible participación de β -catenina-pS33/37/T41 en la cohesión e integridad del segmento inicial, necesaria para ejercer su función de barrera de difusión.

En neuronas más maduras, β -catenina-pS33/37/T41 localizada en SIA es resistente a la extracción con detergentes, y colocaliza con MT acetilados en la misma región. Aunque desconocemos con qué proteínas interacciona, el empleo de agentes despolimerizantes como el nocodazol o estabilizadores como el taxol refleja una relación con MT y una dependencia de β -catenina-pS33/37/T41 con la integridad de la red de MT para su localización en segmento inicial, dependencia que poseen otras proteínas de interacción conocida con MT. Todos estos datos apuntan a una función en segmento inicial del axón de β -catenina-pS33/37/T41 en

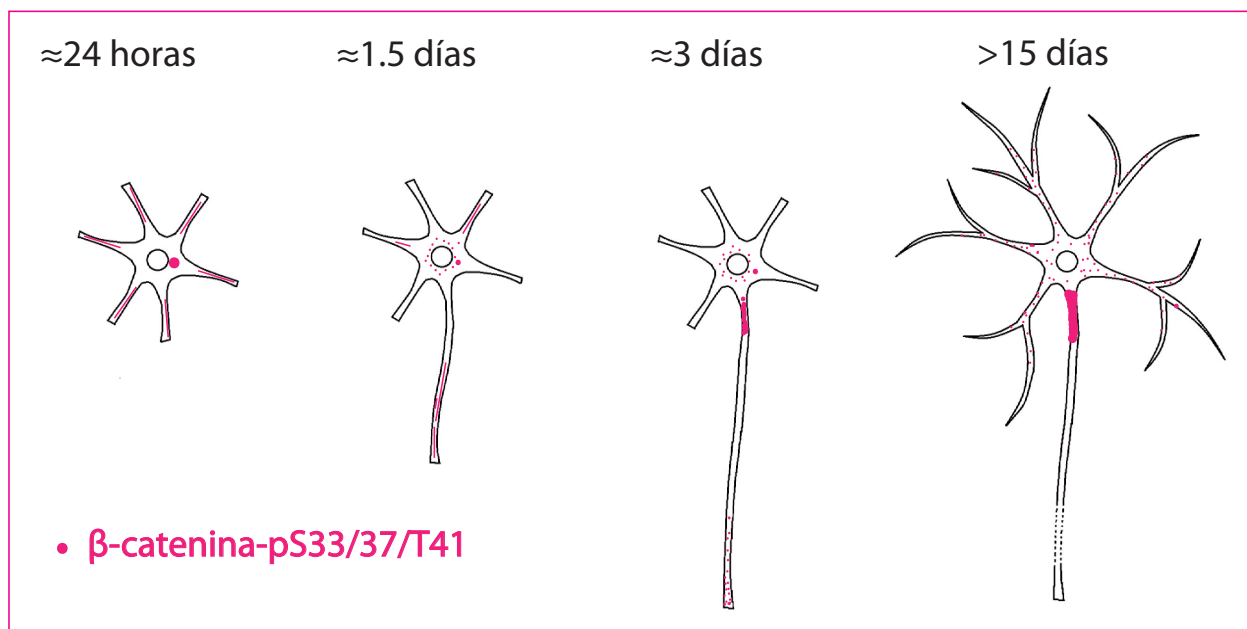


Figura D2. diferentes localizaciones de β -catenina-pS33/37/T41 a lo largo del desarrollo *in vitro* de neuronas de hipocampo.

estabilización y cohesión de estructuras asociadas a MT, función que desempeña en centrosoma.

Por último, nuestros resultados muestran que la inhibición de proteasoma incrementa significativamente los niveles de β -catenina-pS33/37/T41 en el soma neuronal, pero no parece tener ningún efecto en el SIA. En este sentido, la ausencia de APC en segmento inicial (fig. R30) como componente crítico para la destrucción de β -catenina (Polakis, 2007; Su et al, 2008) podría interpretarse como un reflejo de la estabilidad de β -catenina-pS33/37/T41 en el segmento inicial. Alternativamente, como indicamos anteriormente, chaperonas de la familia de 14-3-3 podrían proteger a β -catenina-pS33/37/T41 de la degradación, puesto que también interaccionan con otras proteínas identificadas en el SIA, tales como, L1 y p65 (Aguilera et al., 2006; Ramser et al., 2010).

6 β -CATENINA-PS33/37/T41, NUEVA PROTEÍNA IMPLICADA EN EL PROCESO DE MADURACIÓN FUNCIONAL DEL SIA

Mas allá de las implicaciones funcionales de β -catenina en morfogénesis dendrítica y axonal, nuestros resultados muestran por primera vez una nueva función de β -catenina, una vez fosforilada (S33/37/T41), en la maduración funcional del segmento inicial del axón. Si bien β -catenina-pS33/37/T41 no es necesaria para la formación inicial del SIA, su anclaje posterior durante el proceso de maduración juega un papel crítico en la maduración de las funciones del SIA, modulando la excitabilidad neuronal y las corrientes de sodio dependientes de voltaje.

La reducción de los niveles de β -catenina-pS33/37/T41, por inhibición farmacológica de GSK3 o por

silenciamiento génico de β -catenina, redundante en una clara disminución del anclaje de ankirina G en el SIA (**fig. R35 y R37**). La introducción de un plásmido de interferencia de β -catenina en secciones cerebrales de ratones postnatales P8 (donde los segmentos iniciales están totalmente formados) reproduce el mismo fenotipo encontrado *in vitro*: una ausencia o pérdida significativa de los niveles de ankirina G en SIA (**fig. R39**). Este resultado representa una clara dependencia de β -catenina-pS33/37/T41, no sólo durante el proceso de maduración del SIA, sino en su mantenimiento posterior. Mientras que la localización en SIA de β -catenina-pS33/37/T41 requiere la expresión de ankirina G (**fig. R31**), la ausencia de β -catenina-pS33/37/T41 altera el anclaje de ankirina G en el segmento inicial, lo cual refleja una relación de dependencia mutua para su óptima localización y anclaje en el segmento inicial del axón.

En base a estas nuevas evidencias podríamos definir o matizar con mejor detalle la función que en segmento inicial puede desempeñar β -catenina-pS33/37/T41. Aludiendo a su participación en fijación, anclaje y estabilidad de estructuras es comprensible el aprovechamiento funcional de β -catenina, a medida que la neurona aumenta su complejidad. En este escenario, su posicionamiento tardío en una región que, depende de la maduración estructural y del aporte de nuevos canales y proteínas asociadas, implicaría una función de cohesión estructural asociado a MT. La dependencia que establece sobre otras proteínas como ankirina G, evidencian las nuevas propiedades de interacción con el citoesqueleto que exhibe este dominio en etapas tardías de desarrollo.

Existen antecedentes que demuestran la interacción de β -catenina con determinados canales iónicos, como por ejemplo canales de potasio activados por calcio (Lesage et al., 2004; Bian et al., 2011). Recientemente se ha descrito que β -catenina, independientemente de sus funciones transcripcionales, promueve o fomenta la inserción en membrana de canales de potasio Kv1.5 regulando su actividad (Munoz et al., 2012). Aunque no se ha descrito la interacción entre los canales de sodio dependientes de voltaje y β -catenina, nuestros datos demuestran que la pérdida de β -catenina-pS33/37/T41 disminuye la excitabilidad neuronal, al igual que la amplitud de la corriente de entrada de sodio (**fig. R39**), lo cual coincide con una reducción significativa de la expresión en SIA de canales de sodio dependientes de voltaje (**fig. R37**). Existe una clara relación de dependencia entre la localización de ankirina G y el ensamblaje en segmento inicial de proteínas y canales esenciales para su función (Buffington and Rasband, 2011). Por lo tanto, es más que probable que las alteraciones asociadas a un déficit de canales de sodio se produzcan a consecuencia de una menor inmovilización de ankirina G, y a una pérdida global de integridad del SIA cuando β -catenina-pS33/37/T41 está ausente. De hecho, la integridad del SIA se ve comprometida en ratones *knock-out* de ankirina G (Zhou et al., 1998; Sobotzik et al., 2009), y se ha propuesto que la integridad del SIA puede afectar a las propiedades del potencial de acción (Zonta et al., 2011).

Por otra parte, debemos incluir en esta discusión los posibles efectos adicionales que subyacen de la supresión mantenida de β -catenina. Existe una clara pérdida de la identidad y maduración dendríticas al suprimir los niveles de expresión de β -catenina, como evidencia una reducción en el marcaje de MAP2 y una menor longitud dendrítica total (**fig. R27**). β -catenina es una proteína crítica en la morfogénesis dendrítica (Yu and Malenka, 2003; Gao et al., 2007a), y una variación en sus niveles de expresión puede modular las propiedades de excitabilidad intrínseca de las neuronas (Peng et al., 2009). Este hecho podría redundar en cambios en la excitabilidad global de la neurona y podría distorsionar (ya sea potenciando o mermando) el registro final obtenido. Por lo tanto debemos tener en cuenta pues la existencia de un componente adicional, debido al deterioro dendrítico, al margen de las alteraciones principales observadas en el segmento inicial del axón.

En último lugar debemos comentar los posibles efectos transcripcionales derivados de la reducción en los

niveles de expresión de β -catenina. Si bien no encontramos en la literatura ninguna relación entre la regulación de la expresión génica de ankirina G o canales de sodio dependientes de voltaje por parte del complejo LEF1/ β -catenina, sí se ha descrito que este complejo regula la transcripción del gen del canal de calcio Cav3.1 en neuronas del tálamo (Wisniewska et al., 2010). Los canales de calcio tipo T, (canales Cav3) actuando en sincronía con otros canales de calcio en el SIA pueden regular la generación y la configuración del disparo del potencial de acción (Bender and Trussell, 2009). Aunque los niveles de expresión de β -catenina y LEF1 son cuantitativamente inferiores en neuronas corticales comparadas con neuronas talámicas (Wisniewska et al., 2010), no podemos descartar una posible afectación de la expresión de estos canales en neuronas corticales, en las cuales realizamos los registros electrofisiológicos. Por lo tanto, debemos contar con la posibilidad de que parte de las alteraciones en excitabilidad neuronal observadas sean debidas a la reducción de los niveles de β -catenina *per se*, y a posibles implicaciones transcripcionales.

Sin embargo, si sólo nos basamos en la expresión de β -catenina para explicar las alteraciones observadas en el SIA, caeríamos en una contradicción aparente, puesto que ¿cómo explicar que una bajada en la expresión de β -catenina y una subida o estabilización de sus niveles puedan originar un mismo fenotipo en proteínas del SIA? Según nuestros datos (**fig. R22 y R35**) y de acuerdo con la bibliografía (Rayasam et al., 2009) la inhibición farmacológica de GSK3 aumenta o estabiliza los niveles de β -catenina de forma generalizada. Nuestros datos confirman que la inhibición sostenida de GSK3 por LiCl o un inhibidor específico de GSK3 provoca una pérdida de β -catenina-pS33/37/T41 y reduce la concentración de ankirina G en el SIA (**fig. R35**), fenotipo muy similar al obtenido por el silenciamiento génico de β -catenina. Por lo tanto, podríamos afirmar que los niveles totales de β -catenina no son los principales responsables del fenotipo encontrado en SIA. Con respecto a los efectos no dependientes de β -catenina, GSK3 además participa en la regulación de los canales de potasio KCNQ2 (Kampfhamer et al., 2010) y canales de calcio tipo P/Q (Zhu et al., 2010). Sin embargo, el bloqueo previo de canales de potasio y canales de calcio no altera la atenuación del pico de potencial de acción inducido por la inhibición de GSK3. Por último, tampoco podemos obviar un hecho muy llamativo, que los efectos en la excitabilidad neuronal son más acusados cuando silenciamos el gen de β -catenina, que cuando inhibimos la quinasa GSK3.

La presencia de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA es pues un factor crítico común a dos aproximaciones diferentes, que producen efectos opuestos en los niveles totales de β -catenina, y sin embargo, manifiestan las mismas alteraciones morfológicas y funcionales en el segmento inicial del axón. Por lo tanto, podemos proponer que, aunque la supresión de β -catenina por sí misma puede contribuir a una alteración de la excitabilidad neuronal, la reducción de β -catenina-pS33/37/T41 en SIA, es clave en la desestabilización de la estructura y por consiguiente en la pérdida de integridad funcional del segmento inicial del axón.

En este trabajo una de las incógnitas que quedarían por esclarecer es el verdadero significado de la fosforilación de β -catenina en los residuos regulados por GSK3, y qué tipo de interacciones establece para su anclaje en el segmento inicial. Futuros experimentos nos ayudarán a averiguar si existe una interacción directa o indirecta con proteínas del SIA.

7 NUEVAS IMPLICACIONES FUNCIONALES DE GSK3, β -CATENINA Y HDAC6 EN EL SIA

La quinasa GSK3 está implicada en diferentes procesos del desarrollo neuronal, tales como axonogénesis, crecimiento y guía axonal o sinaptogénesis (Hur and Zhou, 2010). Igualmente en el cerebro adulto, GSK3 también participa activamente en la liberación de neurotransmisores, en el reciclaje de vesículas sinápticas y en fenómenos de plasticidad sináptica (Smillie and Cousin, 2011). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio podríamos incluir a GSK3 en un nuevo escenario: la regulación funcional del segmento inicial del axón. Por un lado, observamos cómo la inhibición sostenida de GSK3 y la reducción drástica de β -catenina-pS33/37/T41 y ankirina G producen alteraciones funcionales en el SIA, que bien podrían acompañar a determinadas patologías neurológicas, desde que se han encontrado en cerebros postmortem de pacientes esquizofrénicos niveles de GSK3 anormalmente reducidos (Nadri et al., 2004), o alteraciones en el anclaje de ankirina G (Cruz et al., 2009). Por otro lado, GSK3 puede regular la actividad de HDAC6, y por lo tanto modificar indirectamente la estructura del citoesqueleto de MT, de la que dependen proteínas del segmento inicial del axón. En definitiva, podemos afirmar que la regulación de GSK3 sobre diferentes sustratos, entre ellos HDAC6 y β -catenina, contribuye al mantenimiento de la función del SIA. No obstante, debido a sus efectos pleiotrópicos, es más que probable que la actividad de GSK3 pueda influir sobre otras moléculas implicadas en la regulación estructural o funcional del segmento inicial. En esta línea, se han descubierto en los últimos años diferentes quinasas localizadas en SIA que regulan el transporte y/o el anclaje de proteínas en este dominio (Vacher and Trimmer, 2010; Leterrier et al., 2011a) e incluso el tamaño del SIA en organismos inferiores (Trunova et al., 2011). La localización de GSK3 en SIA es sólo el principio de una nueva línea de investigación, dirigida a la comprensión total de la actividad de esta quinasa en la regulación morfológica y funcional del SIA.

La proteína HDAC6 participa en la regulación de procesos celulares clave en la generación de diferentes enfermedades neurodegenerativas en el cerebro adulto. Dado que interviene en procesos de formación del agrosoma y promoción de la autofagia, se ha propuesto como diana terapéutica en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas que cursan con la formación anómala de agregados proteicos, como son la enfermedad de Parkinson, de Huntington o la enfermedad de Alzheimer (Du and Jiao, 2011; Guthrie and Kraemer, 2011; Li et al., 2011b). Sin embargo, en contraste con su potencial neuroprotector en estas patologías, la inhibición de HDAC6 mejora el déficit del transporte axonal en el síndrome de Charcot-Marie Tooth (d'Ydewalle et al., 2011) o el transporte de BDNF en la enfermedad de Huntington (Dompierre et al., 2007). Por lo tanto, aunque sea una diana terapéutica potencial, la actividad de HDAC6 debe ser evaluada en profundidad dependiendo del contexto neuronal concreto. En este trabajo aportamos evidencias suficientes que reflejan un nuevo papel de HDAC6 durante el desarrollo y maduración neuronal, que si bien entran en conflicto con otros trabajos similares (Gaub et al., 2010), se pueden explicar atendiendo a su contexto fisiológico concreto.

En otro escenario, β -catenina es una proteína de interés en el campo de la oncología, dado que sus niveles anormalmente elevados se encuentran en un gran número de procesos tumorales. En consecuencia, β -catenina-pS33/37/T41 se ha empleado mayoritariamente como marcador indirecto de la estabilidad de β -catenina, asociado a sus funciones transcripcionales. A la vista de nuestros resultados podemos incorporar un nuevo matiz al empleo de β -catenina-pS33/37/T41 como marcador de integridad del SIA. Por otro lado, una acumulación aberrante de β -catenina-pS33/37/T41 potencia la muerte celular inducida por ROS (*reactive oxygen species*) (Boo et al., 2009) y representa un indicador de la disfunción del proteasoma en procesos patológicos como la enfermedad de Alzheimer (Ghanevati and Miller, 2005).

Por lo tanto, β -catenina-pS33/37/T41, dependiendo de su localización puede actuar como marcador de integridad en un sentido o en otro. Por otro lado, un gran número de trabajos destacan la gran repercusión fisiológica de β -catenina durante el desarrollo. La ausencia de β -catenina en un ratón KO (*knocking-out*) resulta letal durante el desarrollo embrionario (Haegel et al., 1995), y su ausencia en regiones cerebrales determinadas provoca malformaciones y afecta a la neurogénesis en distintos nichos neuronales (Machon et al., 2003; Junghans et al., 2005; Tang et al., 2009). La mayoría de estudios genéticos de ganancia o pérdida de función de β -catenina revelan graves alteraciones morfológicas del cerebro, así como diversos trastornos en poblaciones de precursores neuronales (Brault et al., 2001; Chenn and Walsh, 2003). Con este estudio evidenciamos un nuevo papel de β -catenina-pS33/37/T41 en neurodesarrollo y, concretamente en la maduración del SIA que, en sintonía con publicaciones recientes (Chilov et al., 2011) desvela un papel fundamental de esta fosfo-proteína durante el desarrollo neuronal

Conclusiones

1. HDAC6 se localiza a lo largo del axón y colocaliza con la proteína tau-1 en neuronas de hipocampo. La actividad deacetilasa de HDAC6 en este compartimiento regula la velocidad de crecimiento axonal, modulando principalmente los niveles de acetilación de su sustrato α -tubulina, y participando en los procesos de axonogénesis y elongación axonal.
2. La inhibición o supresión de HDAC6 altera la localización polarizada de la kinesina KIF5C, e incrementa el nivel de acetilación de microtúbulos en neuronas de hipocampo.
3. Los microtúbulos del segmento inicial del axón están acetilados y se caracterizan por su resistencia a la extracción con detergentes. La inhibición farmacológica o supresión mantenida de la expresión de HDAC6, altera la localización restringida en el SIA de microtúbulos acetilados, de canales de sodio dependientes de voltaje y ankirina G, que difunden más allá de la longitud establecida para el segmento inicial.
4. Las propiedades de anclaje de proteínas en el segmento inicial del axón varían en función del estado de maduración neuronal.
5. La inhibición de la actividad de GSK3 incrementa significativamente los niveles de acetilación de α -tubulina en neuronas de hipocampo.
6. Aunque la expresión de GSK3 es ubicua en las neuronas, la quinasa GSK3 esta asociada a la estructura del SIA y es resistente a la extracción con detergentes.
7. β -catenina fosforilada por GSK3 en los residuos S33/37/T41 no solamente constituye un medio para la degradación de la proteína, sino que se localiza en el centrosoma neuronal y aparece asociada al citoesqueleto de MT de neuronas de hipocampo.
8. β -catenina-pS33/37/T41 se localiza de forma progresiva en el SIA de neuronas de hipocampo y corteza durante el desarrollo, *in vitro* e *in vivo*. Esta localización es dependiente de la expresión de ankirina G. Además, β -catenina-pS33/37/T41 comparte las mismas propiedades de resistencia a la extracción con detergentes y depende de la integridad del citoesqueleto de MT asociado al SIA.
9. La reducción de β -catenina-pS33/37/T41 en el SIA, por inhibición de GSK3 o por supresión de los niveles de β -catenina, provoca una pérdida significativa de la concentración específica en el SIA de ankirina G y canales de sodio voltaje dependientes. Asimismo, conlleva la pérdida de la integridad funcional del segmento inicial del axón.

Bibliografía

- Adler CE, Fetter RD, Bargmann CI (2006) UNC-6/Netrin induces neuronal asymmetry and defines the site of axon formation. *Nat Neurosci* 9:511-518.
- Aguilera C, Fernandez-Majada V, Ingles-Esteve J, Rodilla V, Bigas A, Espinosa L (2006) Efficient nuclear export of p65-IkappaBalpha complexes requires 14-3-3 proteins. *J Cell Sci* 119:3695-3704.
- Ahmad FJ, Pienkowski TP, Baas PW (1993) Regional differences in microtubule dynamics in the axon. *J Neurosci* 13:856-866.
- Akella JS, Wloga D, Kim J, Starostina NG, Lyons-Abbott S, Morrisette NS, Dougan ST, Kipreos ET, Gaertig J (2010) MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature* 467:218-222.
- Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM (2011) The role of HDAC6 in cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011:875824.
- Andersen SS, Bi GQ (2000) Axon formation: a molecular model for the generation of neuronal polarity. *Bioessays* 22:172-179.
- Arimura N, Kaibuchi K (2007) Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:194-205.
- Arnold DB (2009) Actin and microtubule-based cytoskeletal cues direct polarized targeting of proteins in neurons. *Sci Signal* 2:pe49.
- Asada N, Sanada K, Fukada Y (2007) LKB1 regulates neuronal migration and neuronal differentiation in the developing neocortex through centrosomal positioning. *J Neurosci* 27:11769-11775.
- Avila J, Dominguez J, Diaz-Nido J (1994) Regulation of microtubule dynamics by microtubule-associated protein expression and phosphorylation during neuronal development. *Int J Dev Biol* 38:13-25.
- Azuma K, Urano T, Horie-Inoue K, Hayashi S, Sakai R, Ouchi Y, Inoue S (2009) Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells. *Cancer Res* 69:2935-2940.
- Baas PW, Black MM (1990) Individual microtubules in the axon consist of domains that differ in both composition and stability. *J Cell Biol* 111:495-509.
- Baas PW, Buster DW (2004) Slow axonal transport and the genesis of neuronal morphology. *J Neurobiol* 58:3-17.
- Baas PW, Black MM, Banker GA (1989) Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 109:3085-3094.
- Baas PW, Vidya Nadar C, Myers KA (2006) Axonal transport of microtubules: the long and short of it. *Traffic* 7:490-498.
- Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 280:26729-26734.
- Bamji SX, Shimazu K, Kimes N, Huelsken J, Birchmeier W, Lu B, Reichardt LF (2003) Role of beta-catenin in synaptic vesicle localization and presynaptic assembly. *Neuron* 40:719-731.
- Barnes AP, Polleux F (2009) Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci* 32:347-381.
- Barnes AP, Solecki D, Polleux F (2008) New insights into the molecular mechanisms specifying neuronal polarity in vivo. *Curr Opin Neurobiol* 18:44-52.
- Barnes AP, Lilley BN, Pan YA, Plummer LJ, Powell AW, Raines AN, Sanes JR, Polleux F (2007) LKB1 and SAD kinases define a pathway required for the polarization of cortical neurons. *Cell* 129:549-563.
- Bender KJ, Trussell LO (2009) Axon initial segment Ca²⁺ channels influence action potential generation and timing. *Neuron* 61:259-271.
- Bender KJ, Ford CP, Trussell LO (2010) Dopaminergic modulation of axon initial segment calcium channels regulates action potential initiation. *Neuron* 68:500-511.
- Bennett V, Gilligan DM (1993) The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu Rev Cell Biol* 9:27-66.
- Bennett V, Healy J (2009) Membrane domains based on ankyrin and spectrin associated with cell-cell interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a003012.
- Berghs S, Aggujaro D, Dirx R, Jr., Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, Solimena M (2000) betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151:985-1002.
- Bertos NR, Gilquin B, Chan GK, Yen TJ, Khochbin S, Yang XJ (2004) Role of the tetradecapeptide repeat domain of human histone deacetylase 6 in cytoplasmic retention. *J Biol Chem* 279:48246-48254.

- Bhat R, Xue Y, Berg S, Hellberg S, Ormo M, Nilsson Y, Radesater AC, Jerning E, Markgren PO, Borgegard T, Nylof M, Gimenez-Cassina A, Hernandez F, Lucas JJ, Diaz-Nido J, Avila J (2003) Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J Biol Chem* 278:45937-45945.
- Bian S, Bai JP, Chapin H, Le Moellic C, Dong H, Caplan M, Sigworth FJ, Navaratnam DS (2011) Interactions between beta-catenin and the HSlo potassium channel regulates HSlo surface expression. *PLoS One* 6:e28264.
- Bienz M (2002) The subcellular destinations of APC proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:328-338.
- Black MM, Baas PW, Humphries S (1989) Dynamics of alpha-tubulin deacetylation in intact neurons. *J Neurosci* 9:358-368.
- Bobrowska A, Paganetti P, Matthias P, Bates GP (2011) Hdac6 knock-out increases tubulin acetylation but does not modify disease progression in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS One* 6:e20696.
- Boiko T, Vakulenko M, Ewers H, Yap CC, Norden C, Winckler B (2007) Ankyrin-dependent and -independent mechanisms orchestrate axonal compartmentalization of L1 family members neurofascin and L1/neuron-glia cell adhesion molecule. *J Neurosci* 27:590-603.
- Boo JH, Song H, Kim JE, Kang DE, Mook-Jung I (2009) Accumulation of phosphorylated beta-catenin enhances ROS-induced cell death in presenilin-deficient cells. *PLoS One* 4:e4172.
- Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S (2007) HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 26:5468-5476.
- Brachet A, Leterrier C, Irondelle M, Fache MP, Racine V, Sibarita JB, Choquet D, Dargent B (2010) Ankyrin G restricts ion channel diffusion at the axonal initial segment before the establishment of the diffusion barrier. *J Cell Biol* 191:383-395.
- Bradke F, Dotti CG (1997) Neuronal polarity: vectorial cytoplasmic flow precedes axon formation. *Neuron* 19:1175-1186.
- Bradke F, Dotti CG (1999) The role of local actin instability in axon formation. *Science* 283:1931-1934.
- Bradke F, Dotti CG (2000) Establishment of neuronal polarity: lessons from cultured hippocampal neurons. *Curr Opin Neurobiol* 10:574-581.
- Brault V, Moore R, Kutsch S, Ishibashi M, Rowitch DH, McMahon AP, Sommer L, Boussadia O, Kemler R (2001) Inactivation of the beta-catenin gene by Wnt1-Cre-mediated deletion results in dramatic brain malformation and failure of craniofacial development. *Development* 128:1253-1264.
- Brechet A, Fache MP, Brachet A, Ferracci G, Baude A, Irondelle M, Pereira S, Leterrier C, Dargent B (2008) Protein kinase CK2 contributes to the organization of sodium channels in axonal membranes by regulating their interactions with ankyrin G. *J Cell Biol* 183:1101-1114.
- Brembeck FH, Rosario M, Birchmeier W (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16:51-59.
- Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W (2004) Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 18:2225-2230.
- Brown A, Slaughter T, Black MM (1992) Newly assembled microtubules are concentrated in the proximal and distal regions of growing axons. *J Cell Biol* 119:867-882.
- Brown A, Li Y, Slaughter T, Black MM (1993) Composite microtubules of the axon: quantitative analysis of tyrosinated and acetylated tubulin along individual axonal microtubules. *J Cell Sci* 104 (Pt 2):339-352.
- Brush MH, Guardiola A, Connor JH, Yao TP, Shenolikar S (2004) Deacetylase inhibitors disrupt cellular complexes containing protein phosphatases and deacetylases. *J Biol Chem* 279:7685-7691.
- Buffington SA, Rasband MN (2011) The axon initial segment in nervous system disease and injury. *Eur J Neurosci* 34:1609-1619.
- Buffington SA, Sobotzik JM, Schultz C, Rasband MN (2012) IkappaBalpha is not required for axon initial segment assembly. *Mol Cell Neurosci*.
- Burbank KS, Mitchison TJ (2006) Microtubule dynamic instability. *Curr Biol* 16:R516-517.
- Cabrero JR, Serrador JM, Barreiro O, Mittelbrunn M, Naranjo-Suarez S, Martin-Cofreces N, Vicente-Manzanares M, Mazitschek R, Bradner JE, Avila J, Valenzuela-Fernandez A, Sanchez-Madrid F (2006) Lymphocyte chemotaxis is regulated by histone deacetylase 6, independently of its deacetylase activity. *Mol Biol Cell* 17:3435-3445.

- Canton DA, Litchfield DW (2006) The shape of things to come: an emerging role for protein kinase CK2 in the regulation of cell morphology and the cytoskeleton. *Cell Signal* 18:267-275.
- Caron C, Boyault C, Khochbin S (2005) Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioessays* 27:408-415.
- Clark BD, Goldberg EM, Rudy B (2009) Electrostatic tuning of the axon initial segment. *Neuroscientist* 15:651-668.
- Conde C, Caceres A (2009) Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci* 10:319-332.
- Cooper LC, Prinsloo E, Edkins AL, Blatch GL (2011) Hsp90alpha/beta associates with the GSK3beta/axin1/phospho-beta-catenin complex in the human MCF-7 epithelial breast cancer model. *Biochem Biophys Res Commun* 413:550-554.
- Craig AM, Banker G (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* 17:267-310.
- Creppe C, Malinouskaya L, Volvert ML, Gillard M, Close P, Malaise O, Laguesse S, Cornez I, Rahmouni S, Ormenese S, Belachew S, Malgrange B, Chapelle JP, Siebenlist U, Moonen G, Chariot A, Nguyen L (2009) Elongator controls the migration and differentiation of cortical neurons through acetylation of alpha-tubulin. *Cell* 136:551-564.
- Cruz DA, Weaver CL, Lovullo EM, Melchitzky DS, Lewis DA (2009) Selective alterations in postsynaptic markers of chandelier cell inputs to cortical pyramidal neurons in subjects with schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 34:2112-2124.
- Cuchillo-Ibanez I, Seereeram A, Byers HL, Leung KY, Ward MA, Anderton BH, Hanger DP (2008) Phosphorylation of tau regulates its axonal transport by controlling its binding to kinesin. *Faseb J* 22:3186-3195.
- Chang J, Baloh RH, Milbrandt J (2009) The NIMA-family kinase Nek3 regulates microtubule acetylation in neurons. *J Cell Sci* 122:2274-2282.
- Chen CS, Weng SC, Tseng PH, Lin HP, Chen CS (2005) Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem* 280:38879-38887.
- Chen S, Owens GC, Makarenkova H, Edelman DB (2010) HDAC6 regulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. *PLoS One* 5:e10848.
- Cheng PL, Lu H, Shelly M, Gao H, Poo MM (2011) Phosphorylation of E3 ligase Smurf1 switches its substrate preference in support of axon development. *Neuron* 69:231-243.
- Chenn A, Walsh CA (2003) Increased neuronal production, enlarged forebrains and cytoarchitectural distortions in beta-catenin overexpressing transgenic mice. *Cereb Cortex* 13:599-606.
- Chilov D, Sinjushina N, Rita H, Taketo MM, Makela TP, Partanen J (2011) Phosphorylated beta-catenin localizes to centrosomes of neuronal progenitors and is required for cell polarity and neurogenesis in developing midbrain. *Dev Biol* 357:259-268.
- d'Ydewalle C, Krishnan J, Chiheb DM, Van Damme P, Irobi J, Kozikowski AP, Vanden Berghe P, Timmerman V, Robberecht W, Van Den Bosch L (2011) HDAC6 inhibitors reverse axonal loss in a mouse model of mutant HSPB1-induced Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Med* 17:968-974.
- Da Silva JS, Hasegawa T, Miyagi T, Dotti CG, Abad-Rodriguez J (2005) Asymmetric membrane ganglioside sialidase activity specifies axonal fate. *Nat Neurosci* 8:606-615.
- David MD, Yeramian A, Dunach M, Llovera M, Canti C, de Herreros AG, Comella JX, Herreros J (2008) Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. *J Cell Sci* 121:2718-2730.
- Debanne D, Campanac E, Bialowas A, Carlier E, Alcaraz G (2011) Axon physiology. *Physiol Rev* 91:555-602.
- Debanne D, Boudkazi S, Campanac E, Cudmore RH, Giraud P, Fronzaroli-Molinieres L, Carlier E, Caillard O (2008) Paired-recordings from synaptically coupled cortical and hippocampal neurons in acute and cultured brain slices. *Nat Protoc* 3:1559-1568.
- Dehmelt L, Halpain S (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6:204.
- Derry WB, Wilson L, Jordan MA (1995) Substoichiometric binding of taxol suppresses microtubule dynamics. *Biochemistry* 34:2203-2211.
- Destaing O, Saltel F, Gilquin B, Chabadel A, Khochbin S, Ory S, Jurdic P (2005) A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci* 118:2901-2911.
- Ding H, Dolan PJ, Johnson GV (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J Neurochem* 106:2119-2130.

- Distel M, Hocking JC, Volkmann K, Koster RW (2010) The centrosome neither persistently leads migration nor determines the site of axonogenesis in migrating neurons in vivo. *J Cell Biol* 191:875-890.
- Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelieres FP, King SJ, Humbert S, Saudou F (2007) Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci* 27:3571-3583.
- Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 8:1454-1468.
- Du G, Jiao R (2011) To prevent neurodegeneration: HDAC6 uses different strategies for different challenges. *Commun Integr Biol* 4:139-142.
- Dunn S, Morrison EE, Liverpool TB, Molina-Paris C, Cross RA, Alonso MC, Peckham M (2008) Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *J Cell Sci* 121:1085-1095.
- Esch T, Lemmon V, Banker G (1999) Local presentation of substrate molecules directs axon specification by cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 19:6417-6426.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2002) Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420:629-635.
- Etienne-Manneville S, Hall A (2003) Cdc42 regulates GSK-3 β and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* 421:753-756.
- Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z (2007) Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem* 282:11221-11229.
- Faux MC, Coates JL, Kershaw NJ, Layton MJ, Burgess AW (2010) Independent interactions of phosphorylated beta-catenin with E-cadherin at cell-cell contacts and APC at cell protrusions. *PLoS One* 5:e14127.
- Ferreira MA, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, Fan J, Kirov G, Perlis RH, Green EK, Smoller JW, Grozeva D, Stone J, Nikolov I, Chambert K, Hamshere ML, Nimgaonkar VL, Moskvina V, Thase ME, Caesar S, Sachs GS, Franklin J, Gordon-Smith K, Ardlie KG, Gabriel SB, Fraser C, Blumenstiel B, Defelice M, Breen G, Gill M, Morris DW, Elkin A, Muir WJ, McGhee KA, Williamson R, MacIntyre DJ, MacLean AW, St CD, Robinson M, Van Beck M, Pereira AC, Kandaswamy R, McQuillin A, Collier DA, Bass NJ, Young AH, Lawrence J, Ferrier IN, Anjorin A, Farmer A, Curtis D, Scolnick EM, McGuffin P, Daly MJ, Corvin AP, Holmans PA, Blackwood DH, Gurling HM, Owen MJ, Purcell SM, Sklar P, Craddock N (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* 40:1056-1058.
- Fiesel FC, Schurr C, Weber SS, Kahle PJ (2011) TDP-43 knockdown impairs neurite outgrowth dependent on its target histone deacetylase 6. *Mol Neurodegener* 6:64.
- Frech M, Andjelkovic M, Ingley E, Reddy KK, Falck JR, Hemmings BA (1997) High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity. *J Biol Chem* 272:8474-8481.
- Fukada M, Hanai A, Nakayama A, Suzuki T, Miyata N, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Yao TP, Kawaguchi Y (2012) Loss of deacetylation activity of hdac6 affects emotional behavior in mice. *PLoS One* 7:e30924.
- Fukata Y, Itoh TJ, Kimura T, Menager C, Nishimura T, Shiromizu T, Watanabe H, Inagaki N, Iwamatsu A, Hotani H, Kaibuchi K (2002) CRMP-2 binds to tubulin heterodimers to promote microtubule assembly. *Nat Cell Biol* 4:583-591.
- Fukushige T, Siddiqui ZK, Chou M, Culotti JG, Gogonea CB, Siddiqui SS, Hamelin M (1999) MEC-12, an alpha-tubulin required for touch sensitivity in *C. elegans*. *J Cell Sci* 112 (Pt 3):395-403.
- Fukushima N, Furuta D, Hidaka Y, Moriyama R, Tsujiuchi T (2009) Post-translational modifications of tubulin in the nervous system. *J Neurochem* 109:683-693.
- Fumoto K, Hoogenraad CC, Kikuchi A (2006) GSK-3 β -regulated interaction of BICD with dynein is involved in microtubule anchorage at centrosome. *Embo J* 25:5670-5682.
- Gaertig J, Cruz MA, Bowen J, Gu L, Pennock DG, Gorovsky MA (1995) Acetylation of lysine 40 in alpha-tubulin is not essential in *Tetrahymena thermophila*. *J Cell Biol* 129:1301-1310.
- Gao X, Arlotta P, Macklis JD, Chen J (2007a) Conditional knock-out of beta-catenin in postnatal-born dentate gyrus granule neurons results in dendritic malformation. *J Neurosci* 27:14317-14325.
- Gao YS, Hubbert CC, Yao TP (2010) The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *J Biol Chem* 285:11219-11226.
- Gao YS, Hubbert CC, Lu J, Lee YS, Lee JY, Yao TP (2007b) Histone deacetylase 6 regulates growth factor-induced actin remodeling and endocytosis. *Mol Cell Biol* 27:8637-8647.

- Garrido JJ, Simon D, Varea O, Wandosell F (2007) GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett* 581:1579-1586.
- Garrido JJ, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Giraud P, Dargent B (2003a) Dynamic compartmentalization of the voltage-gated sodium channels in axons. *Biol Cell* 95:437-445.
- Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Debanne D, Dargent B (2003b) A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300:2091-2094.
- Garver TD, Ren Q, Tuvia S, Bennett V (1997) Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J Cell Biol* 137:703-714.
- Gaub P, Tedeschi A, Puttagunta R, Nguyen T, Schmandke A, Di Giovanni S (2010) HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell Death Differ* 17:1392-1408.
- Geraldo S, Gordon-Weeks PR (2009) Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *J Cell Sci* 122:3595-3604.
- Ghanevati M, Miller CA (2005) Phospho-beta-catenin accumulation in Alzheimer's disease and in aggresomes attributable to proteasome dysfunction. *J Mol Neurosci* 25:79-94.
- Giustiniani J, Daire V, Cantaloube I, Durand G, Pous C, Perdiz D, Baillet A (2009) Tubulin acetylation favors Hsp90 recruitment to microtubules and stimulates the signaling function of the Hsp90 clients Akt/PKB and p53. *Cell Signal* 21:529-539.
- Goldberg EM, Clark BD, Zagha E, Nahmani M, Erisir A, Rudy B (2008) K⁺ channels at the axon initial segment dampen near-threshold excitability of neocortical fast-spiking GABAergic interneurons. *Neuron* 58:387-400.
- Goslin K, Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1507-1516.
- Gottardi CJ, Gumbiner BM (2004) Distinct molecular forms of beta-catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J Cell Biol* 167:339-349.
- Gottardi CJ, Peifer M (2008) Terminal regions of beta-catenin come into view. *Structure* 16:336-338.
- Govek EE, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19:1-49.
- Grozinger CM, Hassig CA, Schreiber SL (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:4868-4873.
- Grubb MS, Burrone J (2010) Activity-dependent relocation of the axon initial segment fine-tunes neuronal excitability. *Nature* 465:1070-1074.
- Gundersen GG, Khawaja S, Bulinski JC (1987) Postpolymerization dephosphorylation of alpha-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. *J Cell Biol* 105:251-264.
- Guthrie CR, Kraemer BC (2011) Proteasome inhibition drives HDAC6-dependent recruitment of tau to aggresomes. *J Mol Neurosci* 45:32-41.
- Gwak J, Cho M, Gong SJ, Won J, Kim DE, Kim EY, Lee SS, Kim M, Kim TK, Shin JG, Oh S (2006) Protein-kinase-C-mediated beta-catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Sci* 119:4702-4709.
- Hadjihannas MV, Bruckner M, Behrens J (2010) Conductin/axin2 and Wnt signalling regulates centrosome cohesion. *EMBO Rep* 11:317-324.
- Haegel H, Larue L, Ohsugi M, Fedorov L, Herrenknecht K, Kemler R (1995) Lack of beta-catenin affects mouse development at gastrulation. *Development* 121:3529-3537.
- Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4389-4394.
- Hahn CM, Kleinholz H, Koester MP, Grieser S, Thelen K, Pollerberg GE (2005) Role of cyclin-dependent kinase 5 and its activator P35 in local axon and growth cone stabilization. *Neuroscience* 134:449-465.
- Halpain S, Dehmelt L (2006) The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 7:224.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hammond JW, Cai D, Verhey KJ (2008) Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol* 20:71-76.
- Hammond JW, Huang CF, Kaech S, Jacobson C, Banker G, Verhey KJ (2010) Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Mol Biol Cell* 21:572-583.

- Harris TJ, Peifer M (2005) Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol* 15:234-237.
- Harris TJ, Tepass U (2010) Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:502-514.
- Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P (1998) Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol* 8:573-581.
- Hedstrom KL, Ogawa Y, Rasband MN (2008) AnkyrinG is required for maintenance of the axon initial segment and neuronal polarity. *J Cell Biol* 183:635-640.
- Hedstrom KL, Xu X, Ogawa Y, Frischknecht R, Seidenbecher CI, Shrager P, Rasband MN (2007) Neurofascin assembles a specialized extracellular matrix at the axon initial segment. *J Cell Biol* 178:875-886.
- Hendriksen J, Jansen M, Brown CM, van der Velde H, van Ham M, Galjart N, Offerhaus GJ, Fagotto F, Fornerod M (2008) Plasma membrane recruitment of dephosphorylated {beta}-catenin upon activation of the Wnt pathway. *J Cell Sci* 121:1793-1802.
- Hernandez F, Langa E, Cuadros R, Avila J, Villanueva N (2010) Regulation of GSK3 isoforms by phosphatases PP1 and PP2A. *Mol Cell Biochem* 344:211-215.
- Hilliard MA, Bargmann CI (2006) Wnt signals and frizzled activity orient anterior-posterior axon outgrowth in *C. elegans*. *Dev Cell* 10:379-390.
- Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A (2005) Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol Cell Biol* 25:9063-9072.
- Hirai S, Banba Y, Satake T, Ohno S (2011) Axon formation in neocortical neurons depends on stage-specific regulation of microtubule stability by the dual leucine zipper kinase-c-Jun N-terminal kinase pathway. *J Neurosci* 31:6468-6480.
- Hirai S, Cui de F, Miyata T, Ogawa M, Kiyonari H, Suda Y, Aizawa S, Banba Y, Ohno S (2006) The c-Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 26:11992-12002.
- Hirokawa N (1982) Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J Cell Biol* 94:129-142.
- Hirokawa N, Takemura R (2005) Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6:201-214.
- Hirokawa N, Noda Y (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* 88:1089-1118.
- Hirokawa N, Niwa S, Tanaka Y (2010) Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* 68:610-638.
- Hook SS, Orian A, Cowley SM, Eisenman RN (2002) Histone deacetylase 6 binds polyubiquitin through its zinc finger (PAZ domain) and copurifies with deubiquitinating enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13425-13430.
- Hu W, Tian C, Li T, Yang M, Hou H, Shu Y (2009) Distinct contributions of Na(v)1.6 and Na(v)1.2 in action potential initiation and backpropagation. *Nat Neurosci* 12:996-1002.
- Huang P, Senga T, Hamaguchi M (2007) A novel role of phospho-beta-catenin in microtubule regrowth at centrosome. *Oncogene* 26:4357-4371.
- Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 417:455-458.
- Hund TJ, Koval OM, Li J, Wright PJ, Qian L, Snyder JS, Gudmundsson H, Kline CF, Davidson NP, Cardona N, Rasband MN, Anderson ME, Mohler PJ (2010) A beta(IV)-spectrin/CaMKII signaling complex is essential for membrane excitability in mice. *J Clin Invest* 120:3508-3519.
- Hur EM, Zhou FQ (2010) GSK3 signalling in neural development. *Nat Rev Neurosci* 11:539-551.
- Ikegami K, Heier RL, Taruishi M, Takagi H, Mukai M, Shimma S, Taira S, Hatanaka K, Morone N, Yao I, Campbell PK, Yuasa S, Janke C, Macgregor GR, Setou M (2007) Loss of alpha-tubulin polyglutamylation in ROSA22 mice is associated with abnormal targeting of KIF1A and modulated synaptic function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3213-3218.
- Inoki K, Ouyang H, Zhu T, Lindvall C, Wang Y, Zhang X, Yang Q, Bennett C, Harada Y, Stankunas K, Wang CY, He X, MacDougald OA, You M, Williams BO, Guan KL (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* 126:955-968.

- Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR (2005) HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem* 280:40282-40292.
- Jacobson C, Schnapp B, Banker GA (2006) A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron* 49:797-804.
- Janke C, Kneussel M (2010) Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends Neurosci* 33:362-372.
- Jenkins SM, Bennett V (2001) Ankyrin-G coordinates assembly of the spectrin-based membrane skeleton, voltage-gated sodium channels, and L1 CAMs at Purkinje neuron initial segments. *J Cell Biol* 155:739-746.
- Jiang H, Guo W, Liang X, Rao Y (2005) Both the establishment and the maintenance of neuronal polarity require active mechanisms: critical roles of GSK-3 β and its upstream regulators. *Cell* 120:123-135.
- Jimbo T, Kawasaki Y, Koyama R, Sato R, Takada S, Haraguchi K, Akiyama T (2002) Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat Cell Biol* 4:323-327.
- Johnston J, Griffin SJ, Baker C, Skrzypiec A, Chernova T, Forsythe ID (2008) Initial segment Kv2.2 channels mediate a slow delayed rectifier and maintain high frequency action potential firing in medial nucleus of the trapezoid body neurons. *J Physiol* 586:3493-3509.
- Junghans D, Hack I, Frotscher M, Taylor V, Kemler R (2005) Beta-catenin-mediated cell-adhesion is vital for embryonic forebrain development. *Dev Dyn* 233:528-539.
- Kaech S, Banker G (2006) Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc* 1:2406-2415.
- Kandel ER, Schwartz TM, Jessel TM (2000) *Principles of Neural Science*, 4th Edition. New York: McGraw-Hill.
- Kapfhamer D, Berger KH, Hopf FW, Seif T, Kharazia V, Bonci A, Heberlein U (2010) Protein Phosphatase 2a and glycogen synthase kinase 3 signaling modulate prepulse inhibition of the acoustic startle response by altering cortical M-Type potassium channel activity. *J Neurosci* 30:8830-8840.
- Kaphzan H, Buffington SA, Jung JJ, Rasband MN, Klann E (2011) Alterations in intrinsic membrane properties and the axon initial segment in a mouse model of angelman syndrome. *J Neurosci* 31:17637-17648.
- Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* 115:727-738.
- Khawaja S, Gundersen GG, Bulinski JC (1988) Enhanced stability of microtubules enriched in detyrosinated tubulin is not a direct function of detyrosination level. *J Cell Biol* 106:141-149.
- Kim AH, Puram SV, Bilimoria PM, Ikeuchi Y, Keough S, Wong M, Rowitch D, Bonni A (2009) A centrosomal Cdc20-APC pathway controls dendrite morphogenesis in postmitotic neurons. *Cell* 136:322-336.
- Kim WY, Zhou FQ, Zhou J, Yokota Y, Wang YM, Yoshimura T, Kaibuchi K, Woodgett JR, Anton ES, Snider WD (2006) Essential roles for GSK-3 α and GSK-3 β -primed substrates in neurotrophin-induced and hippocampal axon growth. *Neuron* 52:981-996.
- Kim YT, Hur EM, Snider WD, Zhou FQ (2011) Role of GSK3 Signaling in Neuronal Morphogenesis. *Front Mol Neurosci* 4:48.
- Kimelman D, Xu W (2006) beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25:7482-7491.
- Kita K, Wittmann T, Nathke IS, Waterman-Storer CM (2006) Adenomatous polyposis coli on microtubule plus ends in cell extensions can promote microtubule net growth with or without EB1. *Mol Biol Cell* 17:2331-2345.
- Klein PS, Melton DA (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:8455-8459.
- Kobayashi T, Storrie B, Simons K, Dotti CG (1992) A functional barrier to movement of lipids in polarized neurons. *Nature* 359:647-650.
- Kole MH, Letzkus JJ, Stuart GJ (2007) Axon initial segment Kv1 channels control axonal action potential waveform and synaptic efficacy. *Neuron* 55:633-647.
- Kole MH, Ilschner SU, Kampa BM, Williams SR, Ruben PC, Stuart GJ (2008) Action potential generation requires a high sodium channel density in the axon initial segment. *Nat Neurosci* 11:178-186.
- Komada M, Soriano P (2002) [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156:337-348.
- Konishi Y, Setou M (2009) Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat Neurosci* 12:559-567.
- Kordeli E, Lambert S, Bennett V (1995) AnkyrinG. A new ankyrin gene with neural-specific isoforms localized at the axonal initial segment and node of Ranvier. *J Biol Chem* 270:2352-2359.

- Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP (2005) HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18:601-607.
- Kozminski KG, Diener DR, Rosenbaum JL (1993) High level expression of nonacetylatable alpha-tubulin in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil Cytoskeleton* 25:158-170.
- Kuba H, Oichi Y, Ohmori H (2010) Presynaptic activity regulates Na(+) channel distribution at the axon initial segment. *Nature* 465:1075-1078.
- Kuijpers M, Hoogenraad CC (2011) Centrosomes, microtubules and neuronal development. *Mol Cell Neurosci* 48:349-358.
- L'Hernault SW, Rosenbaum JL (1985) *Chlamydomonas* alpha-tubulin is posttranslationally modified by acetylation on the epsilon-amino group of a lysine. *Biochemistry* 24:473-478.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lamberti C, Lin KM, Yamamoto Y, Verma U, Verma IM, Byers S, Gaynor RB (2001) Regulation of beta-catenin function by the I κ B kinases. *J Biol Chem* 276:42276-42286.
- LeDizet M, Piperno G (1987) Identification of an acetylation site of *Chlamydomonas* alpha-tubulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:5720-5724.
- Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP (2010a) Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol* 189:671-679.
- Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, Taylor JP, Cuervo AM, Yao TP (2010b) HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *Embo J* 29:969-980.
- Lemaitre G, Walker B, Lambert S (2003) Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem* 278:27333-27339.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Abrams CS (2002) Pleckstrin homology domains and the cytoskeleton. *FEBS Lett* 513:71-76.
- Lesage F, Hibino H, Hudspeth AJ (2004) Association of beta-catenin with the alpha-subunit of neuronal large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:671-675.
- Leterrier C, Brachet A, Dargent B, Vacher H (2011a) Determinants of voltage-gated sodium channel clustering in neurons. *Semin Cell Dev Biol* 22:171-177.
- Leterrier C, Vacher H, Fache MP, d'Ortoli SA, Castets F, Autillo-Touati A, Dargent B (2011b) End-binding proteins EB3 and EB1 link microtubules to ankyrin G in the axon initial segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8826-8831.
- Li D, Xie S, Ren Y, Huo L, Gao J, Cui D, Liu M, Zhou J (2011a) Microtubule-associated deacetylase HDAC6 promotes angiogenesis by regulating cell migration in an EB1-dependent manner. *Protein Cell* 2:150-160.
- Li G, Jiang H, Chang M, Xie H, Hu L (2011b) HDAC6 alpha-tubulin deacetylase: a potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 304:1-8.
- Li X, Kumar Y, Zempel H, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E (2011c) Novel diffusion barrier for axonal retention of Tau in neurons and its failure in neurodegeneration. *Embo J* 30:4825-4837.
- Liao H, Li Y, Brautigan DL, Gundersen GG (1998) Protein phosphatase 1 is targeted to microtubules by the microtubule-associated protein Tau. *J Biol Chem* 273:21901-21908.
- Ligon LA, Karki S, Tokito M, Holzbaur EL (2001) Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nat Cell Biol* 3:913-917.
- Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X (2002) Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-847.
- Lorincz A, Nusser Z (2010) Molecular identity of dendritic voltage-gated sodium channels. *Science* 328:906-909.
- Machon O, van den Bout CJ, Backman M, Kemler R, Krauss S (2003) Role of beta-catenin in the developing cortical and hippocampal neuroepithelium. *Neuroscience* 122:129-143.
- Maher MT, Flozak AS, Stocker AM, Chenn A, Gottardi CJ (2009) Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion. *J Cell Biol* 186:219-228.
- Maher MT, Mo R, Flozak AS, Peled ON, Gottardi CJ (2010) Beta-catenin phosphorylated at serine 45 is spatially uncoupled from beta-catenin phosphorylated in the GSK3 domain: implications for signaling. *PLoS One* 5:e10184.

- Maruta H, Greer K, Rosenbaum JL (1986) The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol* 103:571-579.
- Mathey EK, Derfuss T, Storch MK, Williams KR, Hales K, Woolley DR, Al-Hayani A, Davies SN, Rasband MN, Olsson T, Moldenhauer A, Velhin S, Hohlfeld R, Meinl E, Linington C (2007) Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *J Exp Med* 204:2363-2372.
- Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J* 21:6820-6831.
- Menager C, Arimura N, Fukata Y, Kaibuchi K (2004) PIP3 is involved in neuronal polarization and axon formation. *J Neurochem* 89:109-118.
- Mimori-Kiyosue Y, Shiina N, Tsukita S (2000) Adenomatous polyposis coli (APC) protein moves along microtubules and concentrates at their growing ends in epithelial cells. *J Cell Biol* 148:505-518.
- Mo R, Chew TL, Maher MT, Bellipanni G, Weinberg ES, Gottardi CJ (2009) The terminal region of beta-catenin promotes stability by shielding the Armadillo repeats from the axin-scaffold destruction complex. *J Biol Chem* 284:28222-28231.
- Moon RT (2005) Wnt/beta-catenin pathway. *Sci STKE* 2005:cm1.
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC (2002) Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *J Neurochem* 81:1073-1083.
- Munoz C, Tovolli RH, Sopjani M, Alesutan I, Lam RS, Seeböhm G, Foller M, Lang F (2012) Activation of voltage gated K channel Kv1.5 by beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 417:692-696.
- Murphy PJ, Morishima Y, Kovacs JJ, Yao TP, Pratt WB (2005) Regulation of the dynamics of hsp90 action on the glucocorticoid receptor by acetylation/deacetylation of the chaperone. *J Biol Chem* 280:33792-33799.
- Nadri C, Dean B, Scarr E, Agam G (2004) GSK-3 parameters in postmortem frontal cortex and hippocampus of schizophrenic patients. *Schizophr Res* 71:377-382.
- Nakada C, Ritchie K, Oba Y, Nakamura M, Hotta Y, Iino R, Kasai RS, Yamaguchi K, Fujiwara T, Kusumi A (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat Cell Biol* 5:626-632.
- Nakata T, Hirokawa N (2003) Microtubules provide directional cues for polarized axonal transport through interaction with kinesin motor head. *J Cell Biol* 162:1045-1055.
- Nakata T, Hirokawa N (2007) Neuronal polarity and the kinesin superfamily proteins. *Sci STKE* 2007:pe6.
- Nakata T, Niwa S, Okada Y, Perez F, Hirokawa N (2011) Preferential binding of a kinesin-1 motor to GTP-tubulin-rich microtubules underlies polarized vesicle transport. *J Cell Biol* 194:245-255.
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Nogales E, Wolf SG, Downing KH (1998) Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* 391:199-203.
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD⁺-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11:437-444.
- Oakley JC, Kalume F, Catterall WA (2011) Insights into pathophysiology and therapy from a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* 52 Suppl 2:59-61.
- Ogawa Y, Rasband MN (2008) The functional organization and assembly of the axon initial segment. *Curr Opin Neurobiol* 18:307-313.
- Ogawa Y, Horresh I, Trimmer JS, Bredt DS, Peles E, Rasband MN (2008) Postsynaptic density-93 clusters Kv1 channels at axon initial segments independently of Caspr2. *J Neurosci* 28:5731-5739.
- Ogawa Y, Osés-Prieto J, Kim MY, Horresh I, Peles E, Burlingame AL, Trimmer JS, Meijer D, Rasband MN (2010) ADAM22, a Kv1 channel-interacting protein, recruits membrane-associated guanylate kinases to juxtaparanodes of myelinated axons. *J Neurosci* 30:1038-1048.
- Ohkawa N, Sugisaki S, Tokunaga E, Fujitani K, Hayasaka T, Setou M, Inokuchi K (2008) N-acetyltransferase ARD1-NAT1 regulates neuronal dendritic development. *Genes Cells* 13:1171-1183.
- Okuda T, Yu LM, Cingolani LA, Kemler R, Goda Y (2007) beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13479-13484.
- Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R (1999) E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 112 (Pt 8):1237-1245.

- Palay SL, Sotelo C, Peters A, Orkand PM (1968) The axon hillock and the initial segment. *J Cell Biol* 38:193-201.
- Palazzo A, Ackerman B, Gundersen GG (2003) Cell biology: Tubulin acetylation and cell motility. *Nature* 421:230.
- Pan Z, Kao T, Horvath Z, Lemos J, Sul JY, Cranstoun SD, Bennett V, Scherer SS, Cooper EC (2006) A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. *J Neurosci* 26:2599-2613.
- Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP, Baehrecke EH, Taylor JP (2007) HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature* 447:859-863.
- Paturle-Lafanechere L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D (1994) Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. *J Cell Sci* 107 (Pt 6):1529-1543.
- Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010) The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:9-22.
- Peng YR, He S, Marie H, Zeng SY, Ma J, Tan ZJ, Lee SY, Malenka RC, Yu X (2009) Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development. *Neuron* 61:71-84.
- Penman GA, Leung L, Nathke IS (2005) The adenomatous polyposis coli protein (APC) exists in two distinct soluble complexes with different functions. *J Cell Sci* 118:4741-4750.
- Perdiz D, Mackeh R, Pous C, Baillet A (2011) The ins and outs of tubulin acetylation: more than just a post-translational modification? *Cell Signal* 23:763-771.
- Perez M, Santa-Maria I, de Barreda EG, Zhu X, Cuadros R, Cabrero JR, Sanchez-Madrid F, Dawson HN, Vitek MP, Perry G, Smith MA, Avila J (2009) Tau - an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J Neurochem*.
- Peris L, Wagenbach M, Lafanechere L, Brocard J, Moore AT, Kozielski F, Job D, Wordeman L, Andrieux A (2009) Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *J Cell Biol* 185:1159-1166.
- Piperno G, LeDizet M, Chang XJ (1987) Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J Cell Biol* 104:289-302.
- Pollard TD, Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112:453-465.
- Pollarolo G, Schulz JG, Munck S, Dotti CG (2011) Cytokinesis remnants define first neuronal asymmetry in vivo. *Nat Neurosci* 14:1525-1533.
- Poulain FE, Sobel A (2010) The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci* 43:15-32.
- Prasad BC, Clark SG (2006) Wnt signaling establishes anteroposterior neuronal polarity and requires retromer in *C. elegans*. *Development* 133:1757-1766.
- Pugacheva EN, Jablonski SA, Hartman TR, Henske EP, Golemis EA (2007) HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129:1351-1363.
- Ramser EM, Wolters G, Dityateva G, Dityatev A, Schachner M, Tilling T (2010) The 14-3-3zeta protein binds to the cell adhesion molecule L1, promotes L1 phosphorylation by CKII and influences L1-dependent neurite outgrowth. *PLoS One* 5:e13462.
- Rasband MN (2010) The axon initial segment and the maintenance of neuronal polarity. *Nat Rev Neurosci* 11:552-562.
- Rasband MN (2011) Composition, assembly, and maintenance of excitable membrane domains in myelinated axons. *Semin Cell Dev Biol* 22:178-184.
- Rayasam GV, Tulasi VK, Sodhi R, Davis JA, Ray A (2009) Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br J Pharmacol* 156:885-898.
- Redmond T, Sanchez ER, Bresnick EH, Schlesinger MJ, Toft DO, Pratt WB, Welsh MJ (1989) Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. *Eur J Cell Biol* 50:66-75.
- Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ (2006) Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol* 16:2166-2172.
- Ren Q, Bennett V (1998) Palmitoylation of neurofascin at a site in the membrane-spanning domain highly conserved among the L1 family of cell adhesion molecules. *J Neurochem* 70:1839-1849.

- Ritco-Vonsovici M, Ababou A, Horton M (2007) Molecular plasticity of beta-catenin: new insights from single-molecule measurements and MD simulation. *Protein Sci* 16:1984-1998.
- Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P (1995) The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* 270:5549-5555.
- Rubinsztein DC (2007) Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron* 54:854-856.
- Sadot E, Conacci-Sorrell M, Zhurinsky J, Shnizer D, Lando Z, Zharhary D, Kam Z, Ben-Ze'ev A, Geiger B (2002) Regulation of S33/S37 phosphorylated beta-catenin in normal and transformed cells. *J Cell Sci* 115:2771-2780.
- Saji S, Kawakami M, Hayashi S, Yoshida N, Hirose M, Horiguchi S, Itoh A, Funata N, Schreiber SL, Yoshida M, Toi M (2005) Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene* 24:4531-4539.
- Sanchez-Ponce D, Munoz A, Garrido JJ (2011a) Casein kinase 2 and microtubules control axon initial segment formation. *Mol Cell Neurosci*.
- Sanchez-Ponce D, Tapia M, Munoz A, Garrido JJ (2008) New role of IKK alpha/beta phosphorylated I kappa B alpha in axon outgrowth and axon initial segment development. *Mol Cell Neurosci* 37:832-844.
- Sanchez-Ponce D, DeFelipe J, Garrido JJ, Munoz A (2011b) In vitro maturation of the cisternal organelle in the hippocampal neuron's axon initial segment. *Mol Cell Neurosci* 48:104-116.
- Sandblad L, Busch KE, Tittmann P, Gross H, Brunner D, Hoenger A (2006) The Schizosaccharomyces pombe EB1 homolog Mal3p binds and stabilizes the microtubule lattice seam. *Cell* 127:1415-1424.
- Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, Marcu MG, Tsutsumi S, Beebe K, Cotter RJ, Felts S, Toft D, Karnitz L, Rosen N, Neckers L (2007) An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Mol Cell* 25:151-159.
- Schafer DP, Jha S, Liu F, Akella T, McCullough LD, Rasband MN (2009) Disruption of the axon initial segment cytoskeleton is a new mechanism for neuronal injury. *J Neurosci* 29:13242-13254.
- Schultz C, Konig HG, Del Turco D, Politi C, Eckert GP, Ghebremedhin E, Prehn JH, Kogel D, Deller T (2006) Coincident enrichment of phosphorylated I kappa B alpha, activated IKK, and phosphorylated p65 in the axon initial segment of neurons. *Mol Cell Neurosci* 33:68-80.
- Schulze E, Asai DJ, Bulinski JC, Kirschner M (1987) Posttranslational modification and microtubule stability. *J Cell Biol* 105:2167-2177.
- Schulze TG, Detera-Wadleigh SD, Akula N, Gupta A, Kassem L, Steele J, Pearl J, Strohmaier J, Breuer R, Schwarz M, Propping P, Nothen MM, Cichon S, Schumacher J, Rietschel M, McMahon FJ (2009) Two variants in Ankyrin 3 (ANK3) are independent genetic risk factors for bipolar disorder. *Mol Psychiatry* 14:487-491.
- Schwamborn JC, Muller M, Becker AH, Puschel AW (2007) Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *Embo J* 26:1410-1422.
- Seigneurin-Berny D, Verdel A, Curtet S, Lemerrier C, Garin J, Rousseaux S, Khochbin S (2001) Identification of components of the murine histone deacetylase 6 complex: link between acetylation and ubiquitination signaling pathways. *Mol Cell Biol* 21:8035-8044.
- Shah MM, Migliore M, Valencia I, Cooper EC, Brown DA (2008) Functional significance of axonal Kv7 channels in hippocampal pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:7869-7874.
- Sharma M, Leung L, Brocardo M, Henderson J, Flegg C, Henderson BR (2006) Membrane localization of adenomatous polyposis coli protein at cellular protrusions: targeting sequences and regulation by beta-catenin. *J Biol Chem* 281:17140-17149.
- Shea TB (1999) Selective stabilization of microtubules within the proximal region of developing axonal neurites. *Brain Res Bull* 48:255-261.
- Shelly M, Cancedda L, Heilshorn S, Sumbre G, Poo MM (2007) LKB1/STRAD promotes axon initiation during neuronal polarization. *Cell* 129:565-577.
- Shi SH, Jan LY, Jan YN (2003) Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mPar3/mPar6 and PI 3-kinase activity. *Cell* 112:63-75.
- Shi SH, Cheng T, Jan LY, Jan YN (2004) APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Curr Biol* 14:2025-2032.

- Shida T, Cueva JG, Xu Z, Goodman MB, Nachury MV (2010) The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:21517-21522.
- Smillie KJ, Cousin MA (2011) The Role of GSK3 in Presynaptic Function. *Int J Alzheimers Dis* 2011:263673.
- Sobotzik JM, Sie JM, Politi C, Del Turco D, Bennett V, Deller T, Schultz C (2009) AnkyrinG is required to maintain axo-dendritic polarity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:17564-17569.
- Song AH, Wang D, Chen G, Li Y, Luo J, Duan S, Poo MM (2009) A selective filter for cytoplasmic transport at the axon initial segment. *Cell* 136:1148-1160.
- Song DH, Dominguez I, Mizuno J, Kaut M, Mohr SC, Seldin DC (2003) CK2 phosphorylation of the armadillo repeat region of beta-catenin potentiates Wnt signaling. *J Biol Chem* 278:24018-24025.
- Southwood CM, Peppi M, Dryden S, Tainsky MA, Gow A (2007) Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem Res* 32:187-195.
- Staal FJ, Noort Mv M, Strous GJ, Clevers HC (2002) Wnt signals are transmitted through N-terminally dephosphorylated beta-catenin. *EMBO Rep* 3:63-68.
- Stiess M, Bradke F (2010) Neuronal polarization: The cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol*.
- Stiess M, Maghelli N, Kapitein LC, Gomis-Ruth S, Wilsch-Brauninger M, Hoogenraad CC, Tolic-Norrelykke IM, Bradke F (2010) Axon extension occurs independently of centrosomal microtubule nucleation. *Science* 327:704-707.
- Su Y, Fu C, Ishikawa S, Stella A, Kojima M, Shitoh K, Schreiber EM, Day BW, Liu B (2008) APC is essential for targeting phosphorylated beta-catenin to the SCFbeta-TrCP ubiquitin ligase. *Mol Cell* 32:652-661.
- Susuki K, Rasband MN (2008) Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Curr Opin Cell Biol* 20:616-623.
- Tahirovic S, Bradke F (2009) Neuronal polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a001644.
- Tang M, Miyamoto Y, Huang EJ (2009) Multiple roles of beta-catenin in controlling the neurogenic niche for midbrain dopamine neurons. *Development* 136:2027-2038.
- Tararuk T, Ostman N, Li W, Bjorkblom B, Padzik A, Zdrojewska J, Hongisto V, Herdegen T, Konopka W, Courtney MJ, Coffey ET (2006) JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J Cell Biol* 173:265-277.
- Tian Q, Feetham MC, Tao WA, He XC, Li L, Aebersold R, Hood L (2004) Proteomic analysis identifies that 14-3-3zeta interacts with beta-catenin and facilitates its activation by Akt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15370-15375.
- Tokesi N, Lehotzky A, Horvath I, Szabo B, Olah J, Lau P, Ovadi J (2010) TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6. *J Biol Chem* 285:17896-17906.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Tran AD, Marmo TP, Salam AA, Che S, Finkelstein E, Kabarriti R, Xenias HS, Mazitschek R, Hubbert C, Kawaguchi Y, Sheetz MP, Yao TP, Bulinski JC (2007) HDAC6 deacetylation of tubulin modulates dynamics of cellular adhesions. *J Cell Sci* 120:1469-1479.
- Trunova S, Baek B, Giniger E (2011) Cdk5 regulates the size of an axon initial segment-like compartment in mushroom body neurons of the *Drosophila* central brain. *J Neurosci* 31:10451-10462.
- Utton MA, Vandecandelaere A, Wagner U, Reynolds CH, Gibb GM, Miller CC, Bayley PM, Anderton BH (1997) Phosphorylation of tau by glycogen synthase kinase 3beta affects the ability of tau to promote microtubule self-assembly. *Biochem J* 323 (Pt 3):741-747.
- Vacher H, Trimmer JS (2010) Diverse roles for auxiliary subunits in phosphorylation-dependent regulation of mammalian brain voltage-gated potassium channels. *Pflugers Arch* 462:631-643.
- Vacher H, Yang JW, Cerda O, Autillo-Touati A, Dargent B, Trimmer JS (2011) Cdk-mediated phosphorylation of the Kvbeta2 auxiliary subunit regulates Kv1 channel axonal targeting. *J Cell Biol* 192:813-824.
- Vaillant AR, Zanassi P, Walsh GS, Aumont A, Alonso A, Miller FD (2002) Signaling mechanisms underlying reversible, activity-dependent dendrite formation. *Neuron* 34:985-998.
- Valenzuela-Fernandez A, Cabrero JR, Serrador JM, Sanchez-Madrid F (2008) HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol* 18:291-297.
- Valenzuela-Fernandez A, Alvarez S, Gordon-Alonso M, Barrero M, Ursa A, Cabrero JR, Fernandez G, Naranjo-Suarez S, Yanez-Mo M, Serrador JM, Munoz-Fernandez MA, Sanchez-Madrid F (2005) Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Mol Biol Cell* 16:5445-5454.

- Van Wart A, Trimmer JS, Matthews G (2007) Polarized distribution of ion channels within microdomains of the axon initial segment. *J Comp Neurol* 500:339-352.
- Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P, Cassimeris L (1997) Nanomolar concentrations of nocodazole alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell* 8:973-985.
- Verdel A, Khochbin S (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem* 274:2440-2445.
- Verdel A, Curtet S, Brocard MP, Rousseaux S, Lemercier C, Yoshida M, Khochbin S (2000) Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol* 10:747-749.
- Verhey KJ, Gaertig J (2007) The tubulin code. *Cell Cycle* 6:2152-2160.
- Verheyen EM, Gottardi CJ (2010) Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases. *Dev Dyn* 239:34-44.
- Votin V, Nelson WJ, Barth AI (2005) Neurite outgrowth involves adenomatous polyposis coli protein and beta-catenin. *J Cell Sci* 118:5699-5708.
- Wang L, Brown A (2002) Rapid movement of microtubules in axons. *Curr Biol* 12:1496-1501.
- Watabe M, Nakaki T (2011) Protein kinase CK2 regulates the formation and clearance of aggresomes in response to stress. *J Cell Sci* 124:1519-1532.
- Wayman GA, Kaech S, Grant WF, Davare M, Impey S, Tokumitsu H, Nozaki N, Banker G, Soderling TR (2004) Regulation of axonal extension and growth cone motility by calmodulin-dependent protein kinase I. *J Neurosci* 24:3786-3794.
- Westermann S, Weber K (2003) Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:938-947.
- Wilson L, Panda D, Jordan MA (1999) Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct Funct* 24:329-335.
- Wimmer VC, Reid CA, So EY, Berkovic SF, Petrou S (2010) Axon initial segment dysfunction in epilepsy. *J Physiol* 588:1829-1840.
- Winckler B, Mellman I (1999) Neuronal polarity: controlling the sorting and diffusion of membrane components. *Neuron* 23:637-640.
- Winckler B, Forscher P, Mellman I (1999) A diffusion barrier maintains distribution of membrane proteins in polarized neurons. *Nature* 397:698-701.
- Wisniewska MB, Misztal K, Michowski W, Szczot M, Purta E, Lesniak W, Klejman ME, Dabrowski M, Filipkowski RK, Nagalski A, Mozrzymas JW, Kuznicki J (2010) LEF1/beta-catenin complex regulates transcription of the Cav3.1 calcium channel gene (*Cacna1g*) in thalamic neurons of the adult brain. *J Neurosci* 30:4957-4969.
- Witte H, Neukirchen D, Bradke F (2008) Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol* 180:619-632.
- Wodarz A, Nusse R (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14:59-88.
- Woodgett JR (1990) Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *Embo J* 9:2431-2438.
- Wu G, Xu G, Schulman BA, Jeffrey PD, Harper JW, Pavletich NP (2003) Structure of a beta-TrCP1-Skp1-beta-catenin complex: destruction motif binding and lysine specificity of the SCF(beta-TrCP1) ubiquitin ligase. *Mol Cell* 11:1445-1456.
- Wu X, Tu X, Joeng KS, Hilton MJ, Williams DA, Long F (2008) Rac1 activation controls nuclear localization of beta-catenin during canonical Wnt signaling. *Cell* 133:340-353.
- Xing Y, Takemaru K, Liu J, Berndt JD, Zheng JJ, Moon RT, Xu W (2008) Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure* 16:478-487.
- Xu W, Kimelman D (2007) Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners. *J Cell Sci* 120:3337-3344.
- Yan D, Guo L, Wang Y (2006) Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *J Cell Biol* 174:415-424.
- Yang XJ, Seto E (2008) The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:206-218.
- Yang Y, Ogawa Y, Hedstrom KL, Rasband MN (2007) betaIV spectrin is recruited to axon initial segments and nodes of Ranvier by ankyrinG. *J Cell Biol* 176:509-519.
- Yao TP (2010) The role of ubiquitin in autophagy-dependent protein aggregate processing. *Genes Cancer* 1:779-786.

- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265:17174-17179.
- Yoshimura T, Kawano Y, Arimura N, Kawabata S, Kikuchi A, Kaibuchi K (2005) GSK-3 β regulates phosphorylation of CRMP-2 and neuronal polarity. *Cell* 120:137-149.
- Yu W, Schwei MJ, Baas PW (1996) Microtubule transport and assembly during axon growth. *J Cell Biol* 133:151-157.
- Yu X, Malenka RC (2003) Beta-catenin is critical for dendritic morphogenesis. *Nat Neurosci* 6:1169-1177.
- Yu X, Malenka RC (2004) Multiple functions for the cadherin/catenin complex during neuronal development. *Neuropharmacology* 47:779-786.
- Yu Y, Maureira C, Liu X, McCormick D (2010) P/Q and N channels control baseline and spike-triggered calcium levels in neocortical axons and synaptic boutons. *J Neurosci* 30:11858-11869.
- Yuan A, Sasaki T, Rao MV, Kumar A, Kanumuri V, Dunlop DS, Liem RK, Nixon RA (2009) Neurofilaments form a highly stable stationary cytoskeleton after reaching a critical level in axons. *J Neurosci* 29:11316-11329.
- Zhang X, Zhu J, Yang GY, Wang QJ, Qian L, Chen YM, Chen F, Tao Y, Hu HS, Wang T, Luo ZG (2007a) Dishevelled promotes axon differentiation by regulating atypical protein kinase C. *Nat Cell Biol* 9:743-754.
- Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, Yong S, Salas-Burgos A, Koomen J, Olashaw N, Parsons JT, Yang XJ, Dent SR, Yao TP, Lane WS, Seto E (2007b) HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol Cell* 27:197-213.
- Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *Embo J* 22:1168-1179.
- Zhang Y, Kwon S, Yamaguchi T, Cubizolles F, Rousseaux S, Kneissel M, Cao C, Li N, Cheng HL, Chua K, Lombard D, Mizeracki A, Matthias G, Alt FW, Khochbin S, Matthias P (2008) Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* 28:1688-1701.
- Zhou D, Lambert S, Malen PL, Carpenter S, Boland LM, Bennett V (1998) AnkyrinG is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing. *J Cell Biol* 143:1295-1304.
- Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD (2004) NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3 β and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42:897-912.
- Zhu LQ, Liu D, Hu J, Cheng J, Wang SH, Wang Q, Wang F, Chen JG, Wang JZ (2010) GSK-3 β inhibits presynaptic vesicle exocytosis by phosphorylating P/Q-type calcium channel and interrupting SNARE complex formation. *J Neurosci* 30:3624-3633.
- Zilberman Y, Ballestrem C, Carramusa L, Mazitschek R, Khochbin S, Bershadsky A (2009) Regulation of microtubule dynamics by inhibition of the tubulin deacetylase HDAC6. *J Cell Sci* 122:3531-3541.
- Zonta B, Desmazieres A, Rinaldi A, Tait S, Sherman DL, Nolan MF, Brophy PJ (2011) A critical role for Neurofascin in regulating action potential initiation through maintenance of the axon initial segment. *Neuron* 69:945-956.
- Zou H, Wu Y, Navre M, Sang BC (2006) Characterization of the two catalytic domains in histone deacetylase 6. *Biochem Biophys Res Commun* 341:45-50.
- Zumbrunn J, Kinoshita K, Hyman AA, Nathke IS (2001) Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 β phosphorylation. *Curr Biol* 11:44-49.

Abreviaturas

Ac- α -T/Ac- α -tubulina: α -tubulina acetilada (*Acetylated α -Tubulin*)

ADAM22: *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 22*

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Akt: homólogo del proto-oncogén del virus murino *AKT8*

AnkG: Ankirina G

AP: potencial de acción (*action potencia*)

APC: *Adenomatous polyposis coli gene product*

aPKC: PKC atípica (*atypical Protein kinase C*)

AraC: 1-b-D-arabinofuranosilcytosina

ARN: Ácido Ribonucleico

ATP: adenosín trifosfato (*Adenosine TriPhosphate*)

BDNF: *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

CaMKI: *Calcium/calmodulin dependent protein kinase I*

CAMs: Moléculas de adhesión celular (*Cell Adhesion Molecules*)

Caspr2: *Contactin-associated protein 2*

Cdc42: *Cell division cycle 42*

Cdk: *Cyclin-dependent kinase*

CK1/2: *Casein Kinase 1/2*

CLASP: *CLIP-Associating Proteins*

CLIPs: *Cytoplasmic Linker Proteins*

CRMP2: *Collapsin-Response-Mediator Protein 2*

C-terminal: carboxilo-terminal

DAPI: 4'-6-Diamidino-2-fenilindol (*4'-6-Diamidino-2-phenylindole*)

DD1/DD2: *Deacetylase Domain 1/2*

DeTyr-T: tubulina detirosinada (*DeTyrosinated Tubulin*)

DIV: Días *in vitro*

DMEM: MEM modificado por Dubelco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DNasa: Desoxirribonucleasa

DVL: *Dishevelled*

EB: *End-Binding proteins*

EDTA: Ácido Etilen-diamino-tetra-acético

EGFR: *Epidermal Growth Factor Receptor*

EGTA: Ácido Etilen-glicol-tetra-acético

ERK: Kinasa regulada por señales extracelulares (*Extracellular Signal-Regulated Kinase*)

F-actina: filamentos de actina

FBS: *Fetal Bovine Serum*

Gap43: *Growth associated protein 43*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GSK3: Glucógeno Sintasa Quinasa 3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*)

GTP: guanosín trifosfato (*Guanosine TriPhosphate*).

HBSS: *Hanks Buffer Salt Solution*

HDAC6: Histona Deacetilasa 6

Hepes: N-(2-hidroxietil)-piperacina-N'-(2-ácido etanolsulfónico) (*N-(2-hydroxyetil)-piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)*)

Hsp90: Heat shock protein 90

IC: inmunocitoquímica

IKK: IkB kinases

JIP: JNK-interacting protein

JNK: c-Jun N-terminal kinase

KDa: kilo-Dalton

KHC: Kinesin Heavy Chain

KIF: Kinesin superfamily proteins

KLC: Kinesin Light Chain

KO: Knocking-Ot

LIMK: Lin-11, Isl-1, and Mec-3 kinase

LKB1: Liver Kinase B1

MAP: Microtubule Associated Protein

MCF-7: línea celular de cáncer de mama (Michigan Cancer Foundation – 7)

mDia2: Diaphanous-related formin (, Mus musculus)

MEM: Minimum Essential Media

MF: Microfilamentos de actina

MT: Microtúbulos

MTOC: Microtubule Organizing Center

mTOR: diana de mamíferos de la rapamicina (mammalian Target Of Rapamycin)

NAD⁺: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NB 27: Medio Neurobasal suplementado con B27

Nek3: NIMA-related kinase 3

NES: Nuclear Export Signal

NF-186 : Neurofascina-186

NFκB: Nuclear Factor κappa B

NrCAM : Neuron glia-related CAM

N-terminal: amino terminal

SDS-PAGE: Gel de Electroforesis de Poliacrilamida con SDS (SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis)

Par3-Par6: partitioning defective

PBS: Solución Salina de Fosfato Tamponada (Phosphate-Buffered Saline)

pEGFP: en-hanced Green Fluorescent Protein

PFA: paraformaldehído

PH: (dominio de) homología de pleckstrina (Pleckstrin Homology)

PI3K: Fosfoinosítido 3-quinasa (Phosphoinositide 3-Kinase)

PIP₃: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (Phosphatidyinositol (3,4,5)-triphosphate)

PKA/C: Protein kinase A

PKC: Protein kinase C

PSD-93: Postsynaptic density Protein 93

PTEN: Homólogo de fosfatasa y tensinas (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome 10)

PTM: Modificaciones post-traduccionales (Post-Traductional Modifications)

Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

Rap1b: Ras-related protein 1B

Rho: Ras homolog gene family

Runx2: Runt-related transcription factor 2

SAD: *synapses of amphids defective*

SE14: *tetradecapeptide repeat motifs*

shRNA: *small hairpin RNA*

SIA: *Segmento Inicial del Axón*

SIRT2: *Sirtuin-2*

TAG-1: *transient axonal glycoprotein 1*

TCF/LEF: *T-Cell factor/Lymphoid-enhanced factor*

TDAC: *tubulin deacetylase*

TDP-43: *transactive response DNA-binding protein 43*

TIPs: *plus-end tracking proteins*

TPPP/p25: *Tubulin Polymerization Promoting Protein/p25*

Tyr-T: *tubulina tirosinada (Tyrosinated Tubulin)*

USP: *Ubiquitin-Specific Proteases*

UPS: *Ubiquitin Proteasome System*

α TAT1: *α -tubulin K40 acetyltransferase 1*

β -TRCP1: *F-box protein beta-transducin repeat containing protein 1*

WB: *Western-Blot*